

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



## **Otimização de metodologias quimiotaxonómicas aplicadas ao estudo das comunidades de fitoplâncton**

Joana Patricia de Cabral Figueiredo Rodrigues da Cruz

**Mestrado em Ecologia Marinha**

Dissertação orientada por:  
Ana Cristina Florindo Brito  
Carlos Rafael Borges Mendes



*Escuta, escuta: tenho ainda  
uma coisa a dizer.  
Não é importante, eu sei, não vai  
salvar o mundo, não mudará  
a vida de ninguém – mas quem  
é hoje capaz de salvar o mundo  
ou apenas mudar o sentido  
da vida de alguém?  
Escuta-me, não te demoro.  
É coisa pouca, como a chuvinha  
que vem vindo devagar.  
São três, quatro palavras, pouco  
mais. Palavras que te quero confiar.  
Para que não se extingue o seu lume,  
o seu lume breve.  
Palavras que muito amei,  
que talvez ame ainda.  
Elas são a casa, o sal da língua.*

(Eugénio de Andrade “Sal da Língua”)



**Minha Filha e Avós**



## Agradecimentos

Gostaria de, em primeiro lugar, agradecer à Doutora Ana Brito, Doutor Rafael Mendes e Doutora Carolina Sá, por todo o apoio, incentivo e compreensão prestada durante a orientação desta tese. Serão sempre exemplos como investigadores.

Agradeço também à Vera Veloso e Ana M. Dias pelo auxílio prestado com a análise ao microscópio. Simon Wright, da *Australian Antarctic Division*, pela doação e desenvolvimento do *software* CHEMTAX v.1.95. E à Scottish Association for Marine Science pelas monoculturas utilizadas neste estudo.

À comunidade MAREANA e Unicórnios fundadores, essencialmente, por ter sido sempre acolhida com o maior carinho, e me fazerem sentir em casa. Em especial, a Andreia Tracana que me orientou e ajudou em todos os processos laboratoriais. E um carinho especial para a equipa G|ÂMBIA. Paulo, Pedro e Rui, obrigado por me escutarem durante as horas de trânsito.

À minha família, pois se não fossem os meus pais e avós não teria seguido para mestrado, obrigada pelo incentivo. Obrigado avô por estares sempre a perguntar pelas minhas notas. E ao meu companheiro, Joshua Heumüller, por me ouvir, mesmo que em sonhos, sempre que eu precisasse de discutir alguma dúvida. Quanto a isto agradeço também aos meus irmãos, obrigada Fred por dizeres que sim a tudo e Miguel por achares que estava a fazer ensaios clínicos até ao fim, no entanto, sempre a permitirem que eu falasse e assim conseguisse seguir em frente, nas minhas dúvidas.

No entanto, agradeço, sobretudo à minha filha, Kerstin Cruz, pois foi ela que me motivou a terminar tanto o mestrado quanto a licenciatura. Agora, minha piolha, poderei passar mais tempo contigo.

Obrigado a todos, e peço desculpa se me esqueci de alguém. No entanto, se aconteceu, sou eu a Joana é mais que normal.





Este trabalho foi apresentado, como poster, na seguinte conferência científica:

Cruz J, Mendes CR, Sá CG and Brito AC (2018). Optimization of chemotaxonomic methodologies for phytoplankton studies. *Frontiers in Marine Science, Conference Abstract: IMMR'18 / International Meeting on Marine Research 2018*. DOI: 10.3389/conf.FMARS.2018.06.00097

Parte deste trabalho está também a ser preparado para publicação numa revista internacional:

Cruz J, Mendes CR, Sá CG and Brito AC (em preparação). Optimization of chemotaxonomic methodologies for phytoplankton studies. *Limnology and Oceanography: methods*



## Resumo

As comunidades fitoplanctónicas são os principais produtores primários marinhos e têm um papel fundamental na remoção de CO<sub>2</sub> da atmosfera. Estando na base da maioria das cadeias tróficas marinhas, fornecem cerca de 50% do carbono orgânico global. Neste contexto, é fundamental avaliar a estrutura da comunidade fitoplanctónica, uma vez que uma mudança na sua composição pode ter implicações significativas nas relações tróficas. Além disso, mudanças relacionadas com o clima, como mudanças de temperatura e salinidade, também podem afetar a estrutura da comunidade.

De uma forma geral, diversas metodologias têm sido utilizadas para avaliar a composição da comunidade de fitoplâncton, *e.g.* análises por microscopia e análises moleculares. Além de outras limitações, a microscopia não é apropriada para identificar e quantificar grupos compostos por pequenas células (pico e nano-fitoplâncton) e a análise molecular é geralmente dispendiosa, e de difícil interpretação devido à multiespecificidade das comunidades (quando se analisam amostras naturais desconhecidas). Este estudo está focado na quimiotaxonomia baseada em pigmentos, *i.e.* a classificação de organismos através da análise de pigmentos quantificados através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). A classificação é realizada utilizando um método de fatorização matricial, denominado CHEMTAX. Este método baseia-se no uso de rácios entre pigmentos (utilizados como biomarcadores de diferentes grupos fitoplanctónicos) e clorofila *a* (Chl *a*; que é considerado um *proxy* de biomassa fitoplanctónica) para reconstruir a composição da comunidade. Para tal, é necessário o conhecimento prévio dos rácios de pigmento:Chl *a*, para cada grupo. Estes rácios devem ser ajustados à área de estudo, uma vez que estas proporções variam de acordo com as espécies existentes e as condições ambientais, como luz e nutrientes. Os rácios aplicados são normalmente obtidos da literatura disponível. A definição dos grupos baseia-se numa avaliação da base de dados de pigmentos, especialmente na presença de pigmentos diagnosticantes e quando possível em dados de microscopia. Assim, é possível que algumas decisões tomadas pelo operador possam afetar os resultados obtidos por esta metodologia. O objetivo deste estudo foi o de otimizar as metodologias quimiotaxonómicas para a caracterização das comunidades fitoplanctónicas aplicando esta técnica a condições conhecidas. Para tal, foi utilizada a composição de pigmentos de monoculturas para determinar os rácios iniciais e foram elaboradas misturas com base nessas mesmas monoculturas para avaliar a precisão da aplicação do CHEMTAX na reconstrução da composição das misturas. Testaram-se os impactos de variações: i) nos grupos; ii) nos pigmentos; e iii) na origem dos rácios a introduzir na matriz inicial; e iv) na abordagem, isto é, na forma de processamento dos resultados iniciais do CHEMTAX para a obtenção de resultados otimizados. Os resultados evidenciam a existência de algumas diferenças entre os testes, sendo que aquilo que provoca maiores diferenças nos resultados é a escolha dos grupos e a utilização de pigmentos minoritários na análise. A análise dos resultados permitiu ainda a obtenção de uma lista de recomendações para um uso otimizado da análise HPLC-CHEMTAX. Recomenda-se que sejam feitos esforços na determinação dos grupos constituintes de amostras naturais e obtenção de pigmentos minoritários presentes na amostra, não sendo necessário recorrer ao cultivo de espécies para obter rácios de pigmentos, uma vez que os obtidos na literatura, desde que bem selecionados, traduzem-se em bons resultados quando combinados com uma abordagem que utilize corridas sucessivas.

Palavras chave: fitoplâncton, quimiotaxonomia, HPLC-CHEMTAX, culturas, pigmentos



## Abstract

Phytoplankton communities are the main marine primary producers and have a key role in removing CO<sub>2</sub> from the atmosphere. They form the base of most marine trophic chains, supplying about 50% of the global organic carbon. In this context, it is key to assess the structure of the phytoplankton community, given that a change in its composition may have significant implications in the trophic relationships. Moreover, climate-related changes, such as variations in temperature and salinity, are also likely to affect the structure of the community.

Several approaches have been used to evaluate the composition of the phytoplankton community, from microscopy analyses to molecular analyses. Apart from other limitations, microscopy is not appropriate for identifying and quantifying groups composed of small cells (pico- and nano-phytoplankton) and molecular analysis is costly and still has restrictions in terms of community screening (when analysing unknown field samples). This study is focused on pigment-based chemotaxonomy, i.e. the classification of organisms based on pigments measured through High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The classification is performed using a matrix factorization method, named CHEMTAX. This method relies on the use of ratios between the accessory pigments (used as biomarkers for different phytoplankton groups) and chlorophyll *a* (Chl *a*; index of phytoplankton biomass) to reconstruct the community composition. This requires *a priori* knowledge on the pigment:Chl *a* ratios for each group. These ratios should be adjusted to the study area, given that these vary according to the existing species and the environmental conditions, such as light and nutrients. The ratios applied are commonly retrieved from the available literature. The number of groups are assessed based on the user evaluation of the pigment information and results from microscopy, when these are available. Therefore, a few approximations made by the operator can affect the results obtained by this technique. The aim of this study was to optimize the chemotaxonomic methodologies for the characterization of the phytoplankton communities applying this technique to known conditions. That is, by using monocultures pigment composition to determine the input ratios; and mixtures of the same cultures to assess CHEMTAX accuracy in reconstructing the mixtures composition. This way, impacts of varying the number of pigments and groups incorporated in the input matrix, and the origin of the ratios to be introduced in the input matrix (literature vs cultures) and the approach to be applied in order to obtain the results could be evaluated. Analyses of these outputs indicated that there were little differences between variations, and that biggest variations were induced by grouping and the usage of minority pigments in the analysis. Results also allowed to establish a list of recommendations for the optimized usage of the HPLC-CHEMTAX method. Namely, the importance of the determination of the phytoplankton groups and the assessment of the minority pigments present in the samples, that ratios obtained from the literature, if well selected, make the cultivation of the species unnecessary, if combined with an approach that uses successive runs.

Key words: phytoplankton, chemotaxonomy, HPLC-CHEMTAX, cultures, pigments



## Índice

<b>Lista de Figuras .....</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>xix</b>
<b>Lista de Anexos.....</b>	<b>xxi</b>
<b>Lista de Símbolos e Abreviaturas .....</b>	<b>xxiii</b>
<b>Capítulo 1 Introdução Geral .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Fitoplâncton e a sua importância .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Classificação do fitoplâncton .....	2
<b>1.2. Monitorização de fitoplâncton .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Os pigmentos do fitoplâncton e a Quimiotaxonomia .....</b>	<b>6</b>
<b>1.4. Objetivo .....</b>	<b>9</b>
<b>Capítulo 2 Métodos .....</b>	<b>10</b>
<b>2.1. Desenho Experimental .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Caracterização das Culturas .....</b>	<b>13</b>
2.2.1. Caracterização pigmentar .....	15
2.2.2. Microscopia .....	18
<b>2.3. Quimiotaxonomia através de análise HPLC-CHEMTAX .....</b>	<b>20</b>
2.3.1. Variação de grupos utilizados na matriz de <i>input</i> .....	21
2.3.2. Variação de pigmentos utilizados na matriz de <i>input</i> .....	23
2.3.3. Variação da origem dos rácios na matriz de <i>input</i> .....	25
2.3.4. Variação na abordagem a realizar na análise quimiotaxonómica .....	27
<b>2.4. Análise de Dados.....</b>	<b>27</b>
<b>Capítulo 3 Resultados .....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Resultados diretos da metodologia HPLC-CHEMTAX .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Análise das diferenças obtidas em relação ao resultado esperado.....</b>	<b>39</b>
<b>3.3 Análise de Correlação de Pearson e Regressões lineares.....</b>	<b>41</b>
<b>3.4 Similaridade de Bray-Curtis.....</b>	<b>43</b>
3.4.1. Variação de Grupo .....	45
3.4.2. Variação de pigmentos .....	45
3.4.3. Variação na origem dos rácios.....	45
3.4.4. Variação de abordagem.....	45
<b>3.5 Análise de Ordenação Multivariada .....</b>	<b>51</b>
<b>Capítulo 4 Discussão .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Variação de Grupos.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. Variação de Pigmentos.....</b>	<b>58</b>

4.3. Variação na Origem dos Rácios .....	59
4.4. Variação da abordagem .....	60
4.5. Fatores não testados com influência no output do CHEMTAX.....	60
<b>Capítulo 5 Conclusão .....</b>	<b>62</b>
5.1. Recomendações .....	64
<b>Referências .....</b>	<b>65</b>
<b>Capítulo 6 Anexos.....</b>	<b>72</b>



## Lista de Figuras

Figura 2.1 Esquema do desenho experimental. Este estudo pode dividir-se em quatro etapas base, nomeadamente: 1. Caracterização de Monoculturas; 2. Caracterização de Misturas; 3. Análise Quimiotaxonómica; e 4. Análise de Resultados. ....	12
Figura 2.2 Representação gráfica do volume colocado em cada mistura considerando a sua constituição em percentagem de grupos taxonómicos. ....	14
Figura 2.3 Relação entre a Chl a estimada e a concentração de Chl a obtida por análise de HPLC. ....	17
Figura 2.4 Esquema das variações aos fatores influentes ao executar o programa CHEMTAX, nomeadamente: verde, variação de abordagem; roxo, variação de rácio; laranja, variação de Pigmentos; rosa, variação de grupo. Para cada abordagem foram feitas alterações quanto aos pigmentos, grupos e origem de rácios introduzidos na matriz de input. ....	21
Figura 2.5 Dendrogramas construídos a partir de uma matriz de similaridade de Bray-Curtis, utilizando como método de agregação o critério de Group Average. Em baixo com dados de presença e ausência de pigmentos e em cima com dados de rácios pigmento/Chl a obtidos a partir da Tabela 2.3. Aqui podemos visualizar que as espécies se agrupam corretamente por taxa através do padrão pigmentar, no entanto, ocorrem falhas neste agrupamento quando estas têm pigmentos partilhados com semelhante rácio Chl a/pigmento. ....	22
Figura 3.1 Gráficos de barras exemplificativos dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes. ....	31
Figura 3.2 Gráfico de barras acumulado das diferenças por teste. Note que as diferenças foram calculadas utilizando a concentração de Chl a relativa obtida por CHEMTAX e o respetivo valor estimado (Est., Figura 3.1). Observe-se que em G1, G4 e G5 as diferenças são em geral superiores. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g. G6_Cult_L_tP refere-se a um teste com abordagem L, onde foram mantidos todos os pigmentos (tP) na matriz de input, e considerados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). ....	40
Figura 3.3 Valores de Correlação de Pearson obtidos entre a concentração absoluta de Chl a para cada um dos testes e o valor estimado para cada uma das misturas. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, eg. G6_Cult_L_tP. ....	42
Figura 3.4 Em cima, gráfico de barras acumuladas com composição relativa de concentração de Chl a por mistura. Em baixo, representação de caixa de bigodes com máximo, mínimo, quartis, média (ponto roxo), mediana (barra central) e valores discrepantes (pontos pretos) para os valores de Similaridade de Bray Curtis entre os testes e o valor de Chl a estimado para cada mistura. As caixas azuis representam as misturas com maior variação de resultados para os 108 testes. Note-se que a mistura M30 é a única que contém o grupo Prasino. ....	46

Figura 3.5 Caixa de Bigodes para dados de Similaridade de Bray-Curtis por Teste, sendo que cada ponto representa uma Mistura. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit.... 47

Figura 3.6 Análise Geral através de gráficos de Caixas de bigodes representados por mínimo, máximo, quartis, mediana, média e valores discrepantes dos valores de Similaridade de Bray Curtis obtidos por teste. Na primeira linha apresentam-se os testes agrupados por Grupo; na segunda linha à esquerda testes agrupados por Origem de Rácios; no centro, testes agrupados por Abordagem, e à direita os testes agrupados por Pigmentos. Observa-se que uma alteração nos grupos provoca uma maior variação nos resultados. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit..... 48

Figura 3.7 Caixa de Bigodes para dados de Similaridade de Bray-Curtis associando a Origem dos Rácios à Abordagem..... 49

Figura 3.8 Caixa de Bigodes para dados de Similaridade de Bray-Curtis associando os grupos aos Pigmentos utilizados..... 50

Figura 3.9 Análise de Componentes Principais (PCA). Dois conjuntos formados: i) com G2, G3, e G6 associados às misturas M1, M2, M3, e M14, correlacionadas positivamente com PC1; e ii) com G1, G4, e G5 associados às misturas M8, M21 e M27, correlacionadas negativamente com o PC1..... 52

Figura 3.10 Análise de Componentes Principais (PCA). Dois conjuntos formados: i) com G2, G3, e G6 associados às misturas M1, M2, M3, e M14, correlacionadas com PC1 positivamente; e ii) com G1, G4, e G5 associados às misturas M8, M21 e M27, correlacionadas negativamente com o PC1..... 53

## Lista de Tabelas

Tabela 1.1 Divisões encontradas no fitoplâncton marinho (adaptado de Roy et al. 2011).....	3
Tabela 1.2 Classificação do fitoplâncton quanto ao tamanho, de acordo com Sieburth et al. 1978, adaptado de Sutcliffe et al. 2016. ....	4
Tabela 1.3 Classificação do fitoplâncton quanto ao grupo funcional. Adaptado de Nair et al. 2008.....	4
Tabela 1.4 Principais pigmentos diagnosticantes e respectivos grupos taxonômicos, mais comuns, e a classe de tamanho associada. Adaptado de IOCCG (2014) .....	7
Tabela 2.1 Espécies adquiridas para a realização das misturas a analisar através do CHEMTAX. Espécies organizadas por taxon e com respectivo código CCAP. Junto à espécie encontra-se o número dado à amostra, e junto ao taxon a sigla do mesmo. Estes códigos serão os utilizados, a partir daqui, para identificar a espécie e o taxon.. As espécies utilizadas encontravam-se em fase exponencial de crescimento.....	13
Tabela 2.2 Percentagem do volume de monocultura (linhas) utilizada em cada mistura (colunas). Células em branco representam valores nulos na tabela. ....	14
Tabela 2.3 Concentração pigmentar ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por espécie (monoculturas). Os diferentes <i>taxa</i> estão separados por linhas. ....	16
Tabela 2.4 Concentração de Chl a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) teórica estimada para cada grupo por mistura. À direita apresenta-se também o total de Chl a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) teórica estimada para cada mistura e a Chl a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtida por análise de HPLC de cada mistura. Este valor estimado de Chl a foi obtido através do valor de Chl a obtido da análise de HPLC para cada monocultura e o volume adicionado de cada monocultura à mistura. ....	17
Tabela 2.5 Contagem do número de células ( $\text{Cél L}^{-1}$ ) das monoculturas ao microscópio ótico. Número de células por litro para cada espécie e identificação da respetiva câmara de contagem. Espécies assinaladas como perdidas, correspondem a espécies que durante o transporte para análise ao microscópio sofreram danos.....	18
Tabela 2.6 Biovolume ( $\mu\text{m}^3$ ) médio observado ao microscópio ótico e reportado na literatura para as diferentes monoculturas. Está também indicada a forma geométrica utilizada para o cálculo do biovolume, e respetiva referência.....	19
Tabela 2.7 Concentração de clorofila a por monocultura, obtida através de análise de HPLC e respetiva relação entre a Chl a e as abundâncias (Chl a/Cél) e o biovolume (Chl a/Biov). ....	19
Tabela 2.8 Exemplo de matriz de input, contendo três grupos e quatro pigmentos característicos aos mesmos que permitirão a distribuição da Chl a por parte do programa CHEMTAX. Cada linha representa um grupo/classe identificado como presente nas amostras e cada coluna os rácio pigmento/Chl a a utilizar na sua identificação. ....	20
Tabela 2.9 Exemplo de uma matriz de dados contendo três amostras com a concentração de cinco pigmentos obtidos a partir da análise de HPLC.....	20
Tabela 2.10 Variação de Grupos. Cada linha corresponde a um conjunto de grupos utilizado em cada teste. Coluna 3 indica o número de classes utilizadas.....	21
Tabela 2.11 Representação dos pigmentos presentes em cada grupo. A vermelho estão assinalados os pigmentos não partilhados, únicos ao grupo.....	23
Tabela 2.12 Rácios médios pigmento/Chl a e desvio padrão por grupo.....	24
Tabela 2.13 Matriz de input para CHEMTAX construída com base nos rácios pigmento/Chl a obtidos nas monoculturas analisadas.....	26
Tabela 2.14 Matriz de input para CHEMTAX construída com base nos rácios pigmento/Chl a de culturas encontrados na literatura. ....	26

Tabela 3.1 Sumário dos padrões observados na Figura A1 para cada mistura. Os resultados foram agrupados em 8 Conjuntos consoante o padrão observado. A bold estão assinaladas as misturas representadas na Figura 3.1, como exemplo de cada conjunto. Siglas de acordo com o texto. ....	38
Tabela 3.2 Tabela resumo das diferenças por variação de grupo (G1-G6) calculadas a partir do valor de Chl a relativo, utilizando valores absolutos. Nesta tabela apresenta-se o valor médio ( $\bar{X}$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ ) das diferenças por taxon. ....	39
Tabela 3.3 Tabela resumo para cada taxon, por variação de Grupo (G1-G6) dos valores de Correlação de Pearson obtidos entre a concentração absoluta de Chl a para cada um dos testes e o valor estimado para cada uma das misturas. Com o mínimo (Mín.), máximo (Máx.), média ( $\bar{X}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ). Note que Dino apresentam o valor de Correlação médio mais elevado e Hapto o valor de correlação médio mais baixo. Hapto e Diatom alternam os valores de correlação, ou seja, quando uma tem valores mais elevados a outra tem valores mais baixos. ....	43
Tabela 3.4 Média ( $\bar{X}$ ), máximo (máx.), mínimo (mín.), e desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de Similaridade de Bray-Curtis entre misturas para cada teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g. G6_Cult_L_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP), considerados sete <i>taxa</i> (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que obtêm melhores resultados são G2, G3, e G6. A tabela está organizada por ordem decrescente do valor médio seguido da ordem crescente do valor de desvio padrão. ....	44

## Lista de Anexos

Figura A1 Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes..... 75

Figura A2 Equações lineares exemplo e valor de coeficiente de correlação de Pearson. Representa a relação existente entre a concentração de Chl a obtida por CHEMTAX e o valor teórico estimado (real). As molduras a vermelho representam os testes onde ocorre maior dispersão dos resultados em baixas concentrações, isto é, falsos positivos. Circulos a verde mostram um bom desempenho no teste a baixas concentrações. .... 107

Figura A3 Gráfico de correlações de Pearson entre os valores de Similaridade de Bray-Curtis para as Misturas, ordenado pela semelhança entre os valores de correlação obtidos, agrupamento hierárquico (grelha a bold)..... 110

Tabela A1 Concentração de Chl a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de cada espécie por mistura..... 73

Tabela A2 Número de células por litro de cada espécie por mistura ..... 74

Tabela A3 Biovolume ( $\mu\text{m}^3 \text{L}^{-1}$ ) de cada espécie por mistura..... 74

Tabela A4 Diferenças relativas médias por teste, para cada grupo. Cada valor de diferença, é a média das diferenças entre o valor de concentração de Chl a obtido por CHEMTAX e o valor estimado das 24 misturas para cada teste.  $\bar{X}$  é média da diferença para cada teste e  $\sigma$  é o desvio padrão. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete *taxa* (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6. A tabela está organizada por ordem decrescente do valor médio seguido da ordem crescente do valor de desvio padrão ..... 87

Tabela A5 Valores de Similaridade obtidos para cada teste por mistura. Estes valores foram obtidos através da Similaridade existente entre cada mistura e o valor estimado para a mesma. . Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, e.g.. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete *taxa* (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult)..... 92

Tabela A6 Média ( $\bar{X}$ ), máximo (máx.), mínimo (mín.), e desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de Similaridade de Bray-Curtis entre misturas para cada teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos

os pigmentos (tP) utilizados sete *taxa* (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult)..... 97

Tabela A7 Valores de Correlação de Pearson entre o valor obtido por CHEMTAX para cada mistura e o valor estimado, para cada grupo por teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete *taxa* (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6..... 102

Tabela A8 Correlação de Pearson sem padronização dos *taxa*. ..... 109

## Lista de Símbolos e Abreviaturas

But-Fuco	19'-Butanoiloxifucoxantina
Car(s)	Carotenoides(s)
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
Chl <i>c1</i>	Clorofila <i>c1</i>
Chl <i>c2</i>	Clorofila <i>c2</i>
Chl <i>c2</i> MGDGG	Chlorofila <i>c2</i> Monogalactosil diacilglicerol
Chl <i>c3</i>	Clorofila <i>c3</i>
Chl(s)	Clorofila(s)
Chloro	Chlorophyceae
Chloro+Prasino	Chlorophyceae + Prasinophyceae
Cyano	Cyanophyceae
Diadino	Diadinoxantina
Diat	Diatoxantina
Diatom	Bacillariophyceae
Dino	Dinophyceae
Dinox	Dinoxantina
DMS	Dimetilsulfito
Echin	Equinona
Fuco	Fucoxantina
G1,...,6	Grupo 1,...,6
Hapto	Haptophyta
Hex-fuco	19'-hexanoiloxi-4-fucoxantina
Hex-kfuco	19'-hexanoiloxi-4-ketofucoxantina
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do inglês <i>High Performance Liquid</i>
Lut	Luteína
Myxo	Mixoxantofila
Neo	Neoxantina
PCA	Análise de Componentes Principais
Peri	Peridinina
Prasino	Prasinophyceae
SAMS	Scottish Association for Marine Science
Viola	Violoxantina
Zea	Zeaxantina
$\beta\beta$ -Car	$\beta,\beta$ -Caroteno
$\beta\varepsilon$ -Car	$\beta,\varepsilon$ -Caroteno





# Capítulo 1

**Introdução Geral**

### 1.1. Fitoplâncton e a sua importância

As comunidades fitoplanctônicas dominam os ambientes pelágicos (Reynolds 2006), e embora contribuam apenas para cerca de 1% da biomassa vegetal global (Falkowski 1994), são consideradas cruciais não só para o ecossistema marinho, mas também a nível global, sendo responsáveis por cerca de 50% de toda a produtividade primária global (Falkowski & Raven 2007). Nos ecossistemas marinhos são essenciais na sustentação, direta ou indireta, de todas as comunidades marinhas, sendo a base das redes tróficas (Jeffrey et al. 1997, Falkowski et al. 1998, Reynolds 2006, Goela et al. 2014). Paralelamente, contribuem para importantes processos biogeoquímicos e processos climáticos (Falkowski & Woodhead 1992, Bains et al. 2000) como a formação de núcleos para a condensação de água atmosférica, pela produção de compostos voláteis, como o dimetilsulfeto (DMS) (Malin & Kirst 1997), ou a utilização de dióxido de carbono atmosférico através dos processos fotossintéticos (Falkowski et al. 1998, Jeffrey et al. 1999), atuando indiretamente na estabilização da temperatura terrestre. Para além disto estão ainda envolvidos nos ciclos de elementos como o azoto, oxigénio, fósforo, carbono e enxofre. Desta forma, a composição da comunidade fitoplanctónica é determinante na organização trófica do ecossistema marinho e na eficiência com que a matéria orgânica produzida pela fotossíntese é transferida para níveis tróficos superiores e/ou exportada para o oceano profundo (Finkel et al. 2010, IOCCG 2014).

O fitoplâncton está sujeito às diferentes condições ambientais existentes, nomeadamente temperatura, luminosidade, disponibilidade de nutrientes e estabilidade da coluna de água. Variações nestes parâmetros determinam a dinâmica e estrutura das comunidades de fitoplâncton, pois estas respondem rapidamente às alterações do meio ambiente (Margalef 1978, Glibert 2016). Devido às crescentes emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), a subida da temperatura prevista pelo Painel Intergovernamental sobre Alterações Climáticas (IPCC), pode levar a mudanças na biomassa e composição do fitoplâncton marinho (Doney 2006, IPCC 2014). Torna-se, portanto, evidente a necessidade de monitorização, para compreender de que forma as comunidades de fitoplâncton irão responder a essas mudanças e quais serão as consequências para os níveis tróficos superiores (Hays et al. 2005, Brito et al. 2012).

Assim, e devido à sua importância global, o estudo das comunidades fitoplanctónicas é um caminho fundamental na avaliação ambiental. Não só na compreensão da estrutura e dinâmica dos ecossistemas (isto é, estudos de ecologia marinha), e alterações climáticas, como também nas implicações sociais, nomeadamente na gestão dos recursos marinhos (como stocks de pesca e aquacultura). Posto isto, é essencial desenvolver ferramentas que nos permitam fazer esta caracterização e consequente monitorização, e assim obter resultados mais precisos e de forma mais eficiente.

#### 1.1.1. Classificação do fitoplâncton

O fitoplâncton pode ser classificado quanto ao: i) grupo taxonómico, isto é, considerando as relações evolutivas e filogenéticas; ii) seu tamanho; e iii) tipo funcional, isto é, como interagem com os ciclos biogeoquímicos. Estas classificações estão de alguma forma relacionadas. Por exemplo, a classe taxonómica pode ser indicativa do tamanho das células, que por sua vez pode indicar quais os grupos funcionais considerados.

Em relação à classificação pelo grupo taxonómico, as espécies de cada *taxon* partilham entre si várias características diagnosticantes, nomeadamente a sua constituição pigmentar (Tabela 1.1). Podendo-se dividir de uma forma geral o fitoplâncton em três grandes linhagens: i) linhagem das algas

verdes, com Chl *b*; ii) linhagem das algas vermelhas, com Chl *c*; e iii) linhagem das cianobactérias, única constituída por organismos procariotas (Graham & Wilcox 2000, Roy et al. 2011).

*Tabela 1.1 Divisões encontradas no fitoplâncton marinho (adaptado de Roy et al. 2011)*

<b>Divisão</b>	<b>Linhagem</b>
Cyanophyta (incluem as anteriormente denominadas como Prochlorophyta)	Cianobactéria
Glaucocystophyta	Glaucocystophyta (Único grupo monofilético)
Rhodophyta	Vermelha
Heterokontophyta (e.g. Classe Bacillariophyceae (diatomáceas) e Chrysophyceae)	Vermelha
Haptophyta (e.g. Classe Prymnesiophyceae (cocolitóforos))	Vermelha
Cryptophyta	Vermelha
Dinophyta	Vermelha
Euglenophyta	Verde
Chlorarachniophyta	Verde
Chlorophyta (e.g. Classe Chlorophyceae e Prasinophyceae)	Verde
Streptophyta	Verde

Quanto ao tamanho pode considerar-se que o fitoplâncton se divide em três grandes classes: picoplâncton, nanoplâncton e microplâncton (Sieburth et al. 1978), descritas na Tabela 1.2. O microplâncton é dominante em zonas costeiras pois são em geral ricas em nutrientes devido ao elevado aporte dos mesmos oriundo de terra e também devido ao afloramento de águas mais profundas ricas em nutrientes, processo designado de *upwelling*. Este grupo apresenta, em geral, maior concentração de clorofila *a* (Chl *a*) quando comparado com os demais. O picoplâncton encontra-se geralmente em zonas com baixa concentração em nutrientes, consideradas zonas oligotróficas, características dos giros oceânicos. Por outro lado, o nanoplâncton encontra-se distribuído por todo o globo (Brewin et al. 2010).

Tabela 1.2 Classificação do fitoplâncton quanto ao tamanho, de acordo com Sieburth et al. 1978, adaptado de Sutcliffe et al. 2016.

Classificação	Tamanho	Grupos taxonômicos mais importantes
Picoplâncton	0.2 µm – 2 µm	Cyanophyta
Nanoplâncton	2 µm – 20 µm	Haptophyta, Chlorophyta, Chrysophyta e Cryptophyta
Microplâncton	20 µm – 200 µm	Dinophyta e Bacillariophyceae

Quanto ao grupo funcional as classificações podem ser diversas. Por exemplo, e de uma forma generalista, podem classificar-se em: i) fixadores de azoto; ii) silificadores, iii) calcificadores; e/ou iv) produtores de dimetilsulfetos (Reynolds 2006, Nair et al. 2008, Brotas et al. 2013), como descrito na Tabela 1.3.

Tabela 1.3 Classificação do fitoplâncton quanto ao grupo funcional. Adaptado de Nair et al. 2008.

Grupo funcional	Grupo
Fixadores de azoto	Cyanophyta
Silificadores	Bacillariophyceae
Calcificadores	Haptophyta
Produtores de Dimetilsulfetos	Haptophyta, Dinophyta e Bacillariophyceae

Algumas cianófitas (Cyanophyta), organismos procariotas, são os principais representantes do picoplâncton (Graham & Wilcox 2000, Roy et al. 2011), mas não só. Por exemplo, o *Trichodesmium*, principal género de Cyanophyta em ambientes marinhos tropicais e subtropicais, pertence ao microplâncton (Lima et al. 2019). Apresentam a capacidade de fixar azoto atmosférico e respondem positivamente à disponibilidade de fosfato. Estes encontram-se essencialmente no oceano em zonas oligotróficas (Goericke 1998, Schlüter et al. 2011).

As diatomáceas (Bacillariophyceae) são organismos eucariotas, pertencentes principalmente à fração micro- do fitoplâncton. Apresentam a capacidade de transportar para o fundo oceânico carbono, azoto e sílica, pois têm elevadas dimensões e parede celular (frústula) composta por sílica (pesada), tendo por esse motivo a tendência para afundar (Reynolds 2006, Armbrust 2009). Respondem positivamente ao enriquecimento da água por azoto (nitratos) (Sabater 2009, Olofsson et al. 2019). Surgem frequentemente em zonas com elevada concentração em nutrientes, essencialmente em regiões costeiras de *upwelling*, pois são zonas com maior turbulência permitindo que as células de elevadas dimensões se mantenham à superfície (Brito et al. 2015b, Glibert 2016).

Os dinoflagelados (Dinophyta) são organismos eucariotas pertencentes à fração nano- e micro- do fitoplâncton. Apresentam flagelos, podendo ser autotróficos, mixotróficos e/ou heterotróficos

(Reynolds 2006, Roy et al. 2011). São maioritariamente mais abundantes em zonas calmas com águas bem estratificadas.

As haptófitas (Haptophyta), pertencentes à fração nano- do fitoplâncton, são de extrema importância no ciclo de carbono, nomeadamente os cocolitóforos (pertencentes às Prymnesiophyceae), devido aos cocólitos de carbonato de cálcio que os constituem, sendo também um grupo importante na produção de DMS (principalmente o gênero *Phaeocystis*) (Malin & Steinke 2004, Reynolds 2006). Os cocólitos, constituídos por carbonato de cálcio, quando se decompõem reagem com a água provocando um aumento de pH. Por outro lado, quando afundam levam consigo este carbonato, constituindo um importante componente na dinâmica da bomba biológica (de la Rocha 2006). Estes organismos ocorrem principalmente em zonas temperadas subtropicais e tropicais (Silva et al. 2013).

## 1.2. Monitorização de fitoplâncton

O fitoplâncton pode ser quantificado por exemplo, diretamente a partir de técnicas de microscopia, e/ou utilizando a concentração de Chl *a* como indicador de biomassa (Jeffrey et al. 1999). Este pigmento é rotineiramente quantificado, laboratorialmente, através de técnicas de espectrofotometria, fluorimetria, e cromatografia (Yentsch & Menzel 1963, Jeffrey et al. 1997, Lionard et al. 2008, Jodłowska & Latała 2011), podendo também ser determinado por técnicas de deteção remota (Moisan et al. 2012, Sá et al. 2015, Sutcliffe et al. 2016).

Atualmente os esforços não estão apenas em quantificar o fitoplâncton em geral, mas sim em determinar quais os grupos ou espécies que o constituem, pois cada espécie/grupo funcional terá o seu papel nas teias tróficas, nos ciclos biogeoquímicos e no funcionamento dos ecossistemas. Por outro lado, cada grupo fitoplanctónico tem um perfil pigmentar característico (conjunto de pigmentos diferentes), o que levará a diferenças na eficácia fotossintética (captação da luz) e consequentemente, na sua distribuição na coluna de água de acordo com a penetração da luz em profundidade.

Diversas metodologias podem ser utilizadas para identificação dos grupos constituintes das comunidades de fitoplâncton. Estas metodologias podem basear-se em propriedades óticas, genéticas, morfológicas e bioquímicas. Contudo, na sua maioria são demasiado morosas e requerem demasiados custos e/ou especialistas com elevada experiência (Lionard et al. 2008). Por exemplo, o caso da citometria de fluxo, que ao contrario da microscopia, permite uma rápida contagem das células e identificação eficiente dos grupos, mesmo do picoplancton. Um caso semelhante é o da análise de Ácido Desoxirribonucleico (ADN), que apesar de permitir uma boa identificação taxonómica, em amostras naturais revela-se uma análise de elevada complexidade (Wright & Jeffrey 2006). Atualmente, a utilização de satélite é também uma possibilidade na identificação das classes de fitoplâncton, permitindo determinar quais os locais onde cada fração se encontra distribuída, maioritariamente devido às diferenças na concentração em clorofila apresentadas por cada grupo. No entanto, os resultados obtidos por este método requerem uma validação *in-situ*, por exemplo, via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (Jeffrey et al. 1997, Brito et al. 2015a), método que permite a separação dos vários pigmentos, de acordo com a sua polaridade, permitindo o mapeamento das comunidades de acordo com os seus perfis pigmentares (Wright & Jeffrey 2006, Higgins et al. 2011, Sutcliffe et al. 2016).

A utilização de pigmentos marcadores (ver mais na secção 1.3) obtidos através da técnica de HPLC, é uma técnica alternativa e complementar à microscopia que permite a análise detalhada da composição da comunidade (Schlüter et al. 2000, Garibotti et al. 2003, Roy et al. 2011, Goela et al. 2014). Esta permite ainda detetar as formas mais pequenas de fitoplâncton, como o picoplâncton ou o nanoplâncton, de difícil identificação ao microscópio (Mendes et al. 2016). Apesar da técnica de HPLC permitir a obtenção de todos os pigmentos presentes na amostra (Gieskes & Kraay 1983b,

Wright et al. 1991, Kraay et al. 1992, Millie et al. 1993, Jeffrey et al. 1997, 1999, Hagerthey et al. 2006), são várias as causas que podem levar a erros e/ou más interpretações aquando da extrapolação para a composição da comunidade fitoplanctónica. A capacidade de interpretar dados de pigmentos obtidos por HPLC, de modo a obter a composição do fitoplâncton depende, segundo Hernández (2001): i) da resolução do método de análise empregue (Mendes et al. 2007); ii) do conhecimento teórico da composição pigmentar (*i.e.* assinatura pigmentar) das diferentes classes; iii) da variação das concentrações dos diferentes pigmentos devido a alterações na luminosidade e na concentração de nutrientes (Irigoién et al. 2004, Higgins et al. 2011); iv) e do conhecimento prévio da composição da comunidade, obtido *e.g.* por microscopia.

### 1.3. Os pigmentos do fitoplâncton e a Quimiotaxonomia

No fitoplâncton podem encontrar-se três grupos de pigmentos que atuam na fotossíntese (Mirkovic et al. 2017), as clorofilas (Chls), os carotenoides (Cars) e as ficobiliproteínas. A análise de Chls e Cars, presentes em grupos de algas e bactérias foto-oxigénicas pode ser feita a partir de técnicas de HPLC rotineiras, pois estas famílias de pigmentos são solúveis em solventes orgânicos. Por outro lado, a análise de ficobiliproteínas, presentes, por exemplo, em cianobactérias requer técnicas específicas para proteínas, pois estas são moléculas hidrossolúveis.

Os pigmentos são moléculas que absorvem luz visível (Raven et al. 1996) e/ou participam em processos de foto-proteção. Encontram-se, geralmente, em fitoplâncton eucariota, nos tilacoides no interior dos cloroplastos (Whitmarsh & Govindjee 1999), e em fitoplâncton procariota (Cyanophyta), nos tilacoides livres no citoplasma (Kirk 2011). Alguns destes pigmentos por se encontrarem presentes apenas em algumas algas fotossintéticas, podem funcionar como marcadores quimiotaxonómicos, tanto entre os restantes grupos microbianos marinhos como também dentro das próprias microalgas fotossintéticas.

A quimiotaxonomia permite a identificação de organismos utilizando as características bioquímicas dos mesmos. Esta está dependente da existência de biomarcadores, isto é, da existência de moléculas que ocorram de forma distinta numa dada classe de organismos (Van den Meersche et al. 2008). A presença de biomarcadores na análise, neste caso pigmentos obtidos por HPLC, será indicativa da presença do grupo de organismos. A proporção deste biomarcador em relação a um outro composto que esteja presente em quantidades relativamente elevadas em todos os grupos, permite estimar a composição relativa desse grupo numa determinada amostra (Van den Meersche et al. 2008). Nos organismos fotossintéticos, os carotenoides (e algumas clorofilas) podem ser usados como biomarcadores, e a Chl *a*, essencial à fotossíntese, como composto comum a todos os grupos/classes.

Como já referido anteriormente, quando se utilizam estes pigmentos para quantificação ou identificação das comunidades de fitoplâncton deve ter-se em atenção a variação existente na expressão dos mesmos. As células fitoplanctónicas adaptam a produção dos seus pigmentos consoante as condições ambientais (como luz e nutrientes) (Schlüter et al. 2000), isto é, o conteúdo por célula (a proporção de cada pigmento) será variável com as condições do meio, diferindo não só entre espécies do mesmo grupo, como também dentro da mesma espécie (Mackey et al. 1996). A somar a isto, devido às suas características químicas, os pigmentos necessitam de ser preservados e recolhidos em condições especiais pois são sensíveis à luz, ao calor, à presença de oxigénio, a alterações no pH, e em solução têm tendência a formar isómeros (Wright & Jeffrey 2006).

Apesar da grande diversidade de pigmentos existentes nos grupos de fitoplâncton, isto é, baixa ambiguidade entre eles, muitos são partilhados criando a necessidade de considerar conjuntos de pigmentos marcadores para cada grupo, de modo a distingui-los (Jeffrey et al. 1999, Wright & Jeffrey 2006, Higgins et al. 2011). Ou seja, a maior parte dos *taxa* partilha o mesmo padrão de pigmentos,

tornando difícil a utilização de um único pigmento para cada grupo taxonómico. Assim, para a utilização dos pigmentos na taxonomia de fitoplâncton, deve ter-se em atenção a existência de: i) pigmentos minoritários, pigmentos que surgem em concentração reduzida, ii) pigmentos de confundimento, pigmentos que induzem a erro, ou por serem amplamente partilhados ou por variarem amplamente a concentração intracelular, iii) e pigmentos marcadores ou diagnosticantes, pigmentos que permitem identificação de um grupo, pelas suas quantidades (pigmentos majoritários) ou por serem exclusivos a um determinado *taxon*.

Desta forma, é possível associar pigmentos específicos, diagnosticantes ou indicadores, a grupos taxonómicos ou classes de tamanho, como descrito na Tabela 1.4. De notar que a fucoxantina é um pigmento atípico, no sentido em que está presente numa grande quantidade de grupos fitoplantónicos (Roy et al. 2011), mas devido à sua elevada proporção nas diatomáceas, grupo que é constituído por células de elevada dimensão, e portanto, com elevada quantidade de pigmentos, este é rotineiramente utilizado como indicador deste grupo.

*Tabela 1.4 Principais pigmentos diagnosticantes e respetivos grupos taxonómicos, mais comuns, e a classe de tamanho associada. Adaptado de IOCCG (2014)*

Principais pigmentos diagnosticantes	Grupo taxonómico	Classe de tamanho
Fucoxantina	Bacillariophyceae	Microplâncton
Peridinina	Dinophyta	
<i>19'-hexanoiloxifucoxantina</i>	Haptophyta	
<i>19'-butanoiloxifucoxantina</i>	Haptophyta	Nanoplâncton
<i>Aloxantina</i>	Cryptophyta	
<i>Clorofila-b</i>	Chlorophyta	
<i>Divinil clorofila-b</i>	Prochlorophyta	Picoplâncton
<i>Zeaxantina</i>	Cyanophyta	

Vários métodos foram desenvolvidos para ter todos estes aspectos em consideração e, desta forma, permitir uma análise quimiotaxonómica dos dados de pigmentos obtidos através de HPLC: regressões lineares múltiplas (Gieskes & Kraay 1983a, Uitz et al. 2006, Barlow et al. 2007), equações inversas simultâneas (Everitt et al. 1990, Letelier et al. 1993, Vidussi et al. 2000), factorização matricial (Mackey et al. 1996) e modelos Bayesianos (Van den Meersche et al. 2008). Estes utilizam relações matemáticas para descrever um sistema real. A grande diferença nestes modelos está no modo como fazem a determinação da composição da classe taxonómica a partir dos pigmentos marcadores introduzidos e os rácios esperados para cada classe. Nestes, a maior dificuldade está na determinação dos rácios iniciais, pois apresentam uma elevada variação, e na determinação da classe constituinte da amostra, já que também esta está dependente dos pigmentos presentes ou de outros métodos de análise.

As regressões lineares múltiplas são uma ferramenta exploratória, no entanto, não permitem tirar conclusões acerca da composição da comunidade, permitindo apenas determinar qual a componente principal através da relação entre os vários pigmentos e o total de Chl *a*. Estas não são tão úteis na presença de pigmentos partilhados. Neste método cada classe é determinada por um único pigmento diagnosticante. Por outro lado, as equações inversas simultâneas, foram desenvolvidas na tentativa de resolver o problema com pigmentos partilhados, incorporando na equação não só o rácio pigmento/Chl *a* para o *taxon* em análise, como também o rácio pigmento/Chl *a* dos *taxa* que partilham o pigmento diagnosticante. No entanto, para cada classe é necessária uma equação.

Numa tentativa de desenvolver uma forma expedita de estudar as comunidades de fitoplâncton utilizando os dados de pigmentos obtidos através de HPLC, em 1996 Mackey et al. (1996) desenvolveram, com grande sucesso, o programa CHEMTAX (CHEMical TAXonomy; (Hernández 2001, Irigoien et al. 2004). Este programa utiliza um processo iterativo de factorização matricial de modo a otimizar a associação entre os diferentes pigmentos presentes, permitindo a determinação dos grupos taxonómicos. O CHEMTAX é uma ferramenta útil que permite estimar a contribuição dos diferentes grupos para o total de biomassa de fitoplâncton, e com um bom conhecimento da composição de pigmentos de cada espécie, pode ainda ser usado para determinar a concentração de cada espécie presente (Örnólfsson et al. 2003). No entanto, como identificado pelos autores, este método apresenta várias falhas. Estas falhas têm sido analisadas desde então por vários autores de modo a serem contornadas. Por exemplo, Latasa (2007) utiliza diferentes valores para os rácios iniciais e sucessivas corridas do CHEMTAX, isto é, em cada corrida é utilizada a matriz de *output* como entrada para a próxima. Este método, para além de permitir a quantificação dos *taxa* na comunidade, permite ainda encontrar o melhor ajuste dos rácios dos pigmentos biomarcadores a cada classe algal. No entanto, para aplicação deste método é necessária a definição de uma matriz *input*, que é considerado como a maior dificuldade na utilização do mesmo. Nesta devem ser incluídos: i) os *taxa*, ii) os pigmentos, e iii) os rácios pigmento/Chl *a* para cada grupo taxonómico.

Para além destes métodos, tem sido também utilizada a estatística Baysiana, nomeadamente o método de Estimador de Composição Bayesiana (BCE). Contudo, este método é ainda pouco explorado, permitindo melhores resultados para um número pequeno de amostras e a sua maior diferença para o CHEMTAX é a utilização da informação inserida como probabilidade.

O CHEMTAX e o BCE, ao contrário dos restantes métodos que apenas apresentam uma solução única, procuram para cada amostra a melhor resposta dentro de um conjunto de soluções possíveis. Estes dois métodos permitem ainda a inclusão de grupos taxonómicos com baixa abundância, e a inclusão de um número elevado de pigmentos por classe.

Para a correta aplicação destes métodos será importante determinar e quantificar o efeito das possíveis alterações nos dados de *input* na resposta obtida sobre a composição das comunidades de fitoplâncton. É dentro deste contexto que esta dissertação de mestrado foi desenvolvida.



#### 1.4. Objetivo

O objetivo geral deste estudo é o de contribuir para a otimização das metodologias quimiotaxonómicas utilizadas para a reconstrução da composição das comunidades fitoplanctónicas, em particular do CHEMTAX. Para tal foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- i. Avaliação da importância de quatro fatores na reconstituição de comunidades fitoplanctónicas através de uma metodologia quimiotaxonómica (HPLC-CHEMTAX), nomeadamente:
  - a. Abordagem – influência do método utilizado para aplicação da metodologia HPLC-CHEMTAX na obtenção da matriz de output otimizada;
  - b. Origem dos rácios – influência da escolha dos valores dos rácios pigmento:Chl *a* a usar na matriz de input no resultado final;
  - c. Pigmentos – influência da escolha dos pigmentos a utilizar na matriz de input, no resultado final;
  - d. Grupos – a importância do conhecimento *a priori* dos grupos presentes na amostra, e como a variação na introdução dos mesmos tem influência sobre o resultado final;
- ii. Identificação dos parâmetros mais adequados para a aplicação do HPLC-CHEMTAX, com vista a produzir uma lista de recomendações específicas para esta metodologia.

Para a realização deste estudo, foi necessário recorrer a condições controladas, nomeadamente a culturas puras de microalgas, devidamente caracterizadas em termos pigmentares, de biovolumes e de abundâncias celulares, que serviram de base à produção de uma série de misturas. A composição pigmentar das misturas foi então aplicada em todos os testes efetuados com o HPLC-CHEMTAX, e uma vez que a sua composição era conhecida, permitiu a avaliação do desempenho da metodologia quimiotaxonómica aplicada.

# Capítulo 2

**Métodos**

Neste capítulo serão apresentados os métodos utilizados ao longo deste estudo. Serão abordados os seguintes tópicos: 2.1. Desenho Experimental, que, de forma sucinta, guiará o leitor através dos métodos; 2.2. Caracterização das Culturas, incluindo Caracterização pigmentar, por análise de HPLC (2.2.1), e a caracterização por Microscopia (2.2.2.); 2.3. Quimiotaxonomia, onde se apresenta o programa CHEMTAX e as diversas formas como este foi aplicado [*i.e.* variação de Grupos (2.3.1.) e pigmentos (2.3.2.), variação da origem dos rácios de *input* (2.3.3.), e variação da abordagem (2.3.4.)]; e finalmente, na secção 2.4, a análise estatística efetuada aos resultados obtidos.

## 2.1. Desenho Experimental

De forma a responder aos objetivos propostos, o desenho experimental (Figura 2.1) neste estudo foi dividido em quatro atividades principais, nomeadamente:

1. Caracterização de Monoculturas – foram selecionadas 19 culturas monoespecíficas, isto é, monoculturas, correspondentes a 7 grupos taxonómicos (Chlorophyceae, Prasinophyceae, Cyanophyceae, Bacillariophyceae, Dinophyceae, Pavlovophyceae e Prymnesiophyceae) para serem utilizadas em misturas que simulem amostras de diferentes graus de complexidade. Estas monoculturas foram analisadas de forma a: i) quantificar o número de células e avaliar o tamanho médio das células de cada espécie (através de microscopia); e ii) identificar e quantificar a composição pigmentar (através de análise HPLC). A descrição das culturas puras é apresentada na secção 2.2.
2. Caracterização de Misturas – a partir das monoculturas, referidas no ponto 1, foram feitas misturas, de forma a simular a possível variabilidade existente no meio ambiente, isto é, de forma a ser possível analisar composições que sejam representativas das comunidades fitoplantónicas observadas em ambiente natural. A forma como as misturas foram criadas está descrita na secção 2.2. Estas misturas, de composição conhecida, foram também caracterizadas em termos da sua composição pigmentar, através de análise de HPLC.
3. Análise Quimiotaxonómica (HPLC-CHEMTAX) – através desta análise, a composição da comunidade fitoplantónica, em termos de grupos de organismos (*e.g.* diatomáceas), foi reconstituída utilizando como base os dados de pigmentos. Foram também testados os efeitos da variação de alguns fatores, previamente identificados como podendo ter um efeito significativo nos resultados da análise. Esta metodologia, assim como os testes efetuados, é explicada em detalhe na secção 2.3.
4. Análise de resultados – os resultados obtidos por análise quimiotaxonómica são comparados com os valores esperados (obtidos em 2) de forma a avaliar o impacto que as variações efetuadas (em 3) têm nos resultados obtidos.

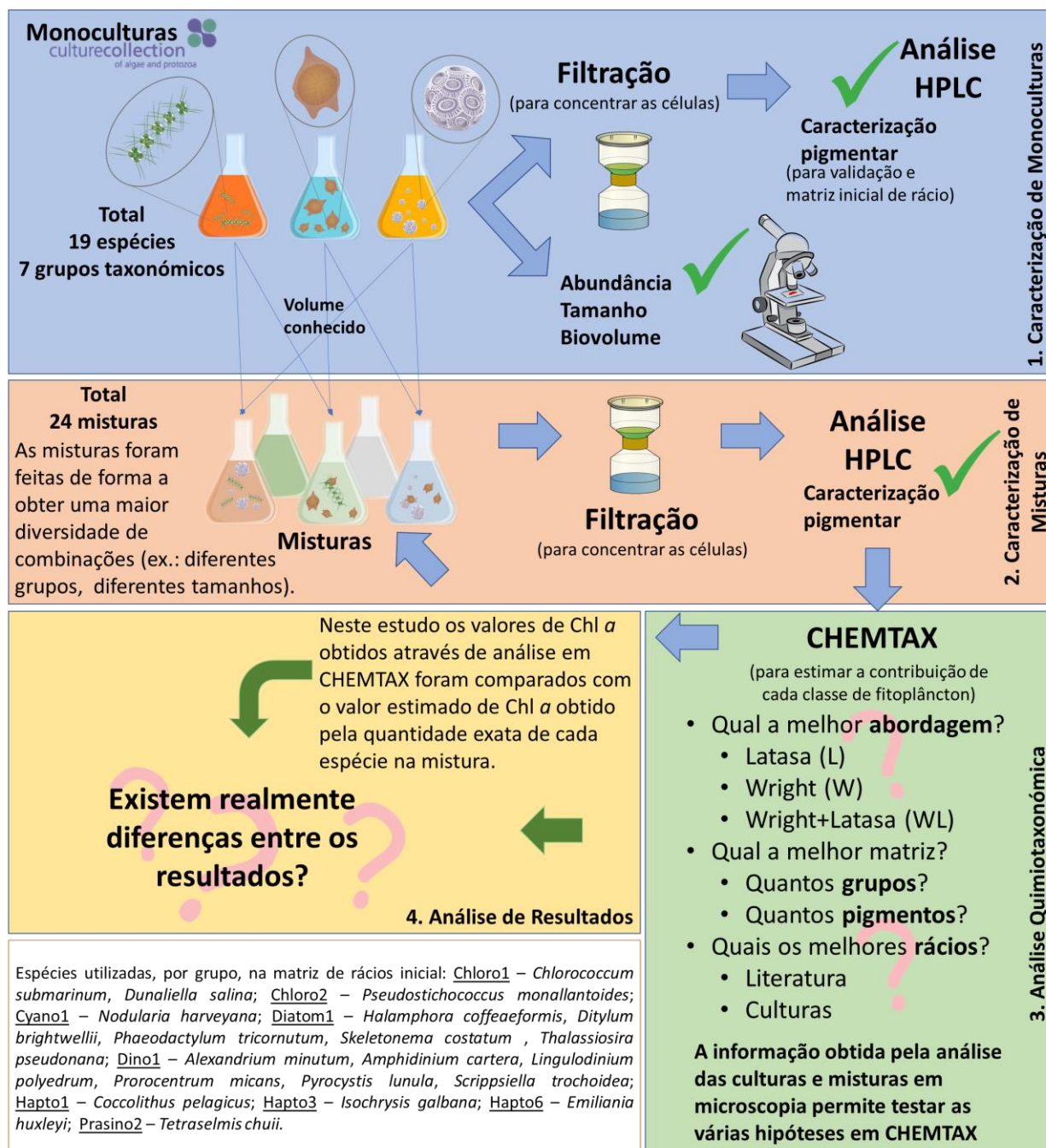


Figura 2.1 Esquema do desenho experimental. Este estudo pode dividir-se em quatro etapas base, nomeadamente: 1. Caracterização de Monoculturas; 2. Caracterização de Misturas; 3. Análise Quimiotaxonômica; e 4. Análise de Resultados.

## 2.2. Caracterização das Culturas

Para a realização deste estudo foram utilizadas 19 monoculturas, isto é, culturas compostas por células de uma só espécie, oriundas da coleção de microalgas do instituto *Scottish Association for Marine Science* (SAMS): *Culture Collection of Algae and Protozoa* (CCAP). As monoculturas encontram-se discriminadas, por grupo taxonómico (*taxon*), na Tabela 2.1, com o respetivo código da coleção. Estas são representativas de 5 grupos taxonómicos, nomeadamente: i) Chlorophyceae+Prasinophyceae (Chloro+Prasino); ii) Cyanophyta (Cyano), iii) Heterokontophyta (incluindo Bacillariophyceae (Diatom)); iv) Dinophyta (com Dinophyceae (Dino)) ; v) Haptophyta (Hapto). Estas foram selecionadas não só tendo em conta a diversidade de grupos, como também a diversidade pigmentar e de formas, com o intuito de representar as comunidades de fitoplâncton de zonas de transição e costeiras. A escolha foi limitada devido a constrangimentos logísticos da própria coleção de microalgas. As amostras foram recolhidas quando as culturas estavam em fase exponencial.

*Tabela 2.1 Espécies adquiridas para a realização das misturas a analisar através do CHEMTAX. Espécies organizadas por taxon e com respetivo código CCAP. Junto à espécie encontra-se o número dado à amostra, e junto ao taxon a sigla do mesmo. Estes códigos serão os utilizados, a partir daqui, para identificar a espécie e o taxon. As espécies utilizadas encontravam-se em fase exponencial de crescimento.*

<b>Taxon</b>	<b>Código CCAP</b>
<b>Chlorophyta (Chloro+Prasino)</b>	
<b>Chlorophyceae (Chloro)</b>	
28 - <i>Pseudostichococcus monallantoides</i>	364/1
13 - <i>Dunaliella salina</i>	19/30
6 - <i>Chlorococcum submarinum</i>	213/10
<b>Prasinophyceae (Prasino)</b>	
34 - <i>Tetraselmis chuii</i>	8/6
<b>Cyanophyta (Cyano)</b>	
<b>Cyanophyceae</b>	
21 - <i>Nodularia harveyana</i>	1452/1
<b>Heterokontophyta</b>	
<b>Bacillariophyceae (Diatom)</b>	
4 - <i>Halaphora coffeaeformis</i>	1001/2
12 - <i>Ditylum brightwellii</i>	1022/1
25 - <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1052/1A
32 - <i>Skeletonema costatum</i>	1077/4
35 - <i>Thalassiosira pseudonana</i>	1085/12
<b>Dinophyta</b>	
<b>Dinophyceae (Dino)</b>	
3 - <i>Alexandrium minutum</i>	1119/49
8 - <i>Amphidinium cartera</i>	1102/1
20 - <i>Lingulodinium polyedrum</i>	1121/2
26 - <i>Prorocentrum micans</i>	1136/20
29 - <i>Pyrocystis lunula</i>	1131/1
31 - <i>Scrippsiella trochoidea</i>	1134/1
<b>Haptophyta (Hapto)</b>	
<b>Pavlovophyceae</b>	
10 - <i>Coccolithus pelagicus</i>	913/3
<b>Prymnesiophyceae</b>	
15 - <i>Emiliana huxleyi</i>	920/8
19 - <i>Isochrysis galbana</i>	927/1

A partir destas monoculturas foram feitas 24 misturas de acordo com as proporções, em volume, apresentadas na Tabela 2.2, por espécie, e na Figura 2.2, por grupo. Os conjuntos [M1, M2, M3], [M6, M27], [M7 M22], [M8, M21], [M12, M17], [M18, M19, M20] e [M25, M26] contêm a mesma proporção de grupos, no entanto, diferente composição específica, o que permitirá avaliar a variabilidade pigmentar e morfológica na análise quimiotaxonómica. Note-se que a proporção em volume não significa, a mesma proporção em Chl *a*.

Tabela 2.2 Percentagem do volume de monocultura (linhas) utilizada em cada mistura (colunas). Células em branco representam valores nulos na tabela.

	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M25	M26	M27	M28	M30
3						50.0		33.3	33.3									25.0		20.0	20.0	25.0		
4	50.0																						25.0	
6																								20.0
8													33.3											
10							50.0										33.3					25.0	25.0	
12		50.0								33.3					25.0						20.0			
13											50.0	33.3		25.0	25.0	25.0			20.0					20.0
15					50.0		50.0		33.3					25.0	25.0	25.0	33.3		20.0					
19																	33.3					25.0	25.0	
20								33.3										25.0		20.0	20.0			
21											50.0	33.3							20.0					
25																							25.0	
26												33.3		25.0	25.0			25.0		20.0	20.0	25.0		
28																								40.0
29										33.3			33.3			25.0		25.0		20.0	20.0			
31				50.0	50.0	50.0																		
32			50.0					33.3	33.3										20.0		20.0			
34																								20.0
35	50.0	50.0	50.0	50.0						33.3			33.3	25.0		25.0			20.0					

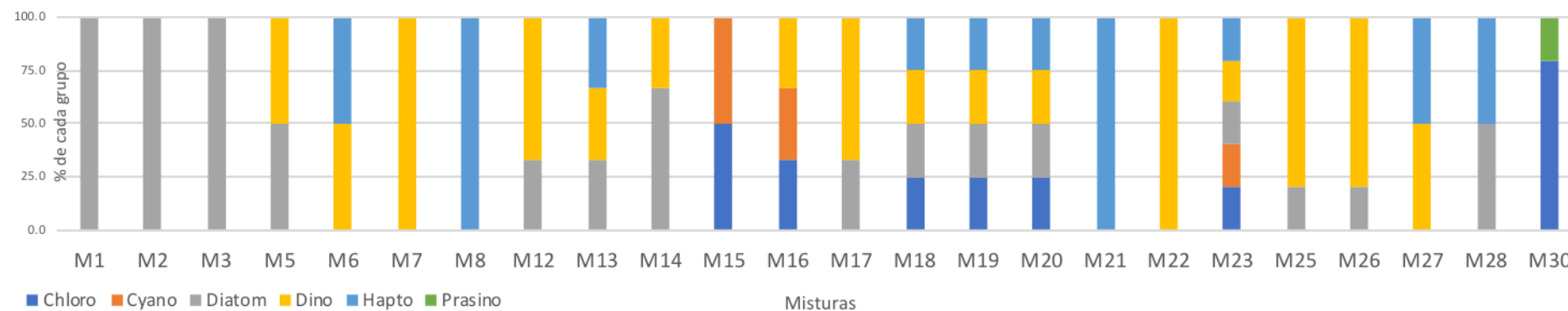


Figura 2.2 Representação gráfica do volume colocado em cada mistura considerando a sua constituição em percentagem de grupos taxonômicos.

### 2.2.1. Caracterização pigmentar

Para a caracterização pigmentar das amostras (monoculturas e misturas) filtraram-se 10 mL, na ausência de luz, em filtros de microfibras de vidro GF/F da Whatman, com poro de 0.7  $\mu\text{m}$  e diâmetro de 25 mm, usando uma rampa de filtração acoplada a um sistema de vácuo. Os filtros foram imediatamente congelados a - 80 °C, onde foram armazenados até ao momento da análise dos pigmentos fitoplantónicos através de HPLC.

Imediatamente antes de se começar a análise de HPLC, foi feita a extração dos pigmentos. Os filtros foram colocados em tubos de centrifuga, de 10 mL, triturados com 3 mL de metanol tamponado a frio (2% acetato de amónio) contendo 0.05 mg L<sup>-1</sup> de *trans- $\beta$ -apo-8'-carotenal* usado como padrão interno e colocados no escuro, a - 20 °C, durante 30 min. Cada amostra foi depois colocada num banho frio de ultra sons durante 5 min. As amostras regressaram novamente ao escuro, onde ficaram por mais 30 min a - 20 °C. Por fim, as amostras foram a centrifugar a 4000 rpm por 15 min a - 4 °C. O sobrenadante foi filtrado através de um filtro de membrana *Fluoropore* PTFE hidrofóbico com poro de 0.22  $\mu\text{m}$ , e diâmetro de 13 mm. 1 mL desse sobrenadante foi então colocado num *vial*, recipiente próprio para a injeção em HPLC. Neste recipiente foram colocadas previamente 0.4 mL de água de pureza própria para HPLC. A separação dos pigmentos foi feita utilizando uma coluna de cromatografia C8 de fase reversa (Symmetry; 15 cm de comprimento; 4.6 mm de diâmetro e 3.5  $\mu\text{m}$  de tamanho das partículas), com um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup> e um volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$ . A corrida foi feita por 30 min seguindo o método de Zapata et al. (2000). A identificação dos pigmentos foi feita através do espectro de absorção e do tempo de retenção, no detetor de fotodiodos (SPD-M10AVP) e de fluorescência (RF-10AXL). A integração, quantificação da área representada por cada pico, foi feita usando o programa LC-Solution. Esta metodologia, obriga a uma calibração prévia com pigmentos puros, que permita não só saber os tempos de retenção de cada pigmento, considerando a coluna e método de corrida utilizados, mas também calibrar a correspondência entre as áreas dos picos e as concentrações reais dos pigmentos. Para esta calibração foram utilizados pigmentos padrão do DHI (*Institute for Water and Environment, Denmark*). No fim, a concentração dos pigmentos (Tabela 2.3) foi normalizada considerando os valores das áreas do padrão interno. Considerando que a concentração do padrão interno é conhecida com a análise de um 'branco', os valores medidos para este pigmento nas amostras permitem corrigir possíveis problemas com perdas e alterações de volume, bem como minimizar erros causados por flutuações no sinal analítico.

Para as misturas, apresentadas na Tabela 2.2, a concentração de Chl *a* foi medida a partir de HPLC. No entanto, a proporção de cada grupo na mistura, em unidades de concentração de Chl *a*, foi estimada a partir das concentrações de Chl *a* obtidas, por HPLC, para cada monocultura (Tabela 2.3), considerando o volume adicionado de cada uma das monoculturas na mistura. Na Tabela 2.4 e Tabela A2 (em anexo), encontra-se a concentração de Chl *a* estimada para cada grupo na mistura (em anexo, Tabela A1, por monocultura). Na Figura 2.3 mostra-se a relação existente entre o valor de Chl *a* obtido por HPLC e o o valor estimado para cada mistura. Não se utilizou a Chl *a* obtida diretamente da análise de HPLC pois esta é o total de Chl *a* na mistura, não nos dando informação a respeito da concentração de cada grupo na mistura, para posteriores comparações com os resultados de CHEMTAX.

Tabela 2.3 Concentração pigmentar ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) por espécie (monoculturas). Os diferentes taxa estão separados por linhas.

C\P	Chl c3	Chl c2	Chl c1	Peri	But-fuco	Fuco	Neo	Hex-kfuco	Viola	Myxo	Hex-fuco	Diadino	Dino	Diato	Zea	Lut	Chl b	Echin	Chl c2 MGDG	βε-Car	ββ-Car	Chl a
Chloro1	6						5.3·10 <sup>01</sup>		2.0·10 <sup>01</sup>						8.6·10 <sup>-01</sup>	1.5·10 <sup>02</sup>	4.2·10 <sup>02</sup>			2.0·10 <sup>01</sup>	2.3·10 <sup>01</sup>	8.6·10 <sup>02</sup>
	13						9.6·10 <sup>01</sup>		1.0·10 <sup>02</sup>						1.3·10 <sup>01</sup>	2.6·10 <sup>02</sup>	7.2·10 <sup>02</sup>				2.6·10 <sup>02</sup>	2.2·10 <sup>03</sup>
Chloro2	28						1.0·10 <sup>02</sup>		1.2·10 <sup>02</sup>						1.2·10 <sup>01</sup>	5.8·10 <sup>01</sup>	1.2·10 <sup>03</sup>			3.0·10 <sup>01</sup>	5.4·10 <sup>01</sup>	2.0·10 <sup>03</sup>
Cyano1	21									1.7·10 <sup>02</sup>								1.2·10 <sup>02</sup>			1.9·10 <sup>02</sup>	2.1·10 <sup>03</sup>
Diatom1	4	7.1·10 <sup>01</sup>	1.7·10 <sup>02</sup>			9.0·10 <sup>02</sup>						1.7·10 <sup>02</sup>		1.6·10 <sup>01</sup>						6.1·10 <sup>01</sup>	1.8·10 <sup>03</sup>	
	12	1.1·10 <sup>02</sup>	5.6·10 <sup>01</sup>			4.8·10 <sup>02</sup>						3.9·10 <sup>01</sup>		2.7·10 <sup>00</sup>						1.8·10 <sup>01</sup>	6.7·10 <sup>02</sup>	
	25	1.5·10 <sup>02</sup>	1.1·10 <sup>02</sup>			1.0·10 <sup>03</sup>						2.9·10 <sup>02</sup>		5.7·10 <sup>00</sup>						4.9·10 <sup>01</sup>	1.9·10 <sup>03</sup>	
	32	5.3·10 <sup>01</sup>	2.0·10 <sup>01</sup>			9.6·10 <sup>01</sup>						1.7·10 <sup>01</sup>		2.1·10 <sup>00</sup>						3.9·10 <sup>00</sup>	1.6·10 <sup>02</sup>	
	35	4.4·10 <sup>01</sup>	6.4·10 <sup>01</sup>			4.2·10 <sup>02</sup>						1.0·10 <sup>02</sup>		1.9·10 <sup>01</sup>						1.3·10 <sup>01</sup>	6.3·10 <sup>02</sup>	
Dino1	3	2.5·10 <sup>02</sup>		5.8·10 <sup>02</sup>								1.0·10 <sup>02</sup>	5.3·10 <sup>01</sup>	3.2·10 <sup>00</sup>						3.4·10 <sup>01</sup>	1.0·10 <sup>03</sup>	
	8	7.8·10 <sup>02</sup>		9.1·10 <sup>02</sup>								3.0·10 <sup>02</sup>	5.5·10 <sup>01</sup>	1.8·10 <sup>01</sup>						5.3·10 <sup>01</sup>	2.0·10 <sup>03</sup>	
	20	1.0·10 <sup>02</sup>		2.1·10 <sup>02</sup>								3.6·10 <sup>01</sup>	2.2·10 <sup>01</sup>	2.6·10 <sup>00</sup>						1.4·10 <sup>01</sup>	4.3·10 <sup>02</sup>	
	26	2.8·10 <sup>02</sup>		7.0·10 <sup>02</sup>								1.1·10 <sup>02</sup>	3.2·10 <sup>01</sup>							1.6·10 <sup>01</sup>	7.1·10 <sup>02</sup>	
	29	1.0·10 <sup>02</sup>		2.9·10 <sup>02</sup>								4.6·10 <sup>01</sup>	1.5·10 <sup>01</sup>	1.6·10 <sup>00</sup>						9.6·10 <sup>00</sup>	4.1·10 <sup>02</sup>	
	31	5.3·10 <sup>02</sup>		1.1·10 <sup>03</sup>								1.9·10 <sup>02</sup>	6.7·10 <sup>01</sup>	1.8·10 <sup>00</sup>						3.3·10 <sup>01</sup>	1.8·10 <sup>03</sup>	
Hapto1	10	5.3·10 <sup>01</sup>	8.0·10 <sup>01</sup>		1.0·10 <sup>00</sup>	4.2·10 <sup>02</sup>				1.0·10 <sup>00</sup>	9.1·10 <sup>01</sup>		1.7·10 <sup>01</sup>							3.5·10 <sup>01</sup>	1.0·10 <sup>03</sup>	
Hapto3	19	1.2·10 <sup>02</sup>	1.0·10 <sup>02</sup>			7.0·10 <sup>02</sup>					4.4·10 <sup>02</sup>		3.2·10 <sup>01</sup>					3.2·10 <sup>01</sup>		6.6·10 <sup>01</sup>	2.3·10 <sup>03</sup>	
Hapto6	15	1.2·10 <sup>02</sup>	8.8·10 <sup>01</sup>		9.6·10 <sup>00</sup>	2.6·10 <sup>02</sup>		5.5·10 <sup>+01</sup>		3.6·10 <sup>01</sup>	3.6·10 <sup>01</sup>		1.4·10 <sup>00</sup>					2.5·10 <sup>01</sup>	2.5·10 <sup>00</sup>	5.9·10 <sup>00</sup>	3.7·10 <sup>02</sup>	
Prasino2	34						1.7·10 <sup>02</sup>		1.6·10 <sup>02</sup>						6.9·10 <sup>00</sup>	3.3·10 <sup>02</sup>	1.5·10 <sup>03</sup>				1.2·10 <sup>02</sup>	2.3·10 <sup>03</sup>

Lista de pigmentos: Chl *a* Clorofila *a*; Chl *b* Clorofila *b*; Chl *c1* Clorofila *c1*; Chl *c2* Clorofila *c2*; Chl *c2* MGDG Chlorofila *c2* Monogalactosil diacilglicerol; Diadino Diadinoxantina; Diato Diatoxantina; Dinoo Dinooxantina; Echin Equinona; Fuco Fucoxantina; Hex-fuco 19'-hexanoiloxi-4-fucoxantina; Hex-kfuco 19'-hexanoiloxi-4-ketofucoxantina; Lut Luteína; Myxo Mixoxantofila; Neo Neoxantina; Peri Peridinina; Viola Violoxantina; Zea Zeaxantina;  $\beta\beta$ -Car  $\beta,\beta$ -Caroteno;  $\beta\epsilon$ -Car  $\beta,\epsilon$ -Caroteno.



Tabela 2.4 Concentração de Chl *a* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) teórica estimada para cada grupo por mistura. À direita apresenta-se também o total de Chl *a* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) teórica estimada para cada mistura e a Chl *a* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) obtida por análise de HPLC de cada mistura. Este valor estimado de Chl *a* foi obtido através do valor de Chl *a* obtido da análise de HPLC para cada monocultura e o volume adicionado de cada monocultura à mistura.

	Chloro+Prasino	Cyano	Diatom	Dino	Hapto	Chl <i>a</i> estimada	Chl <i>a</i> HPLC
M1	0	0	$12.6 \cdot 10^2$	0	0	$1.26 \cdot 10^3$	$1.22 \cdot 10^3$
M2	0	0	$6.57 \cdot 10^2$	0	0	$0.68 \cdot 10^3$	$0.80 \cdot 10^3$
M3	0	0	$4.02 \cdot 10^2$	0	0	$0.40 \cdot 10^3$	$0.36 \cdot 10^3$
M5	0	0	$3.19 \cdot 10^2$	$9.37 \cdot 10^2$	0	$1.26 \cdot 10^3$	$1.45 \cdot 10^3$
M6	0	0	0	$9.37 \cdot 10^2$	$1.85 \cdot 10^2$	$1.12 \cdot 10^3$	$1.26 \cdot 10^3$
M7	0	0	0	$14.7 \cdot 10^2$	0	$1.47 \cdot 10^3$	$1.62 \cdot 10^3$
M8	0	0	0	0	$7.27 \cdot 10^2$	$0.73 \cdot 10^3$	$0.78 \cdot 10^3$
M12	0	0	$0.55 \cdot 10^2$	$5.02 \cdot 10^2$	0	$0.56 \cdot 10^3$	$0.75 \cdot 10^3$
M13	0	0	$0.55 \cdot 10^2$	$3.57 \cdot 10^2$	$1.23 \cdot 10^2$	$0.54 \cdot 10^3$	$0.60 \cdot 10^3$
M14	0	0	$4.38 \cdot 10^2$	$1.39 \cdot 10^2$	0	$0.58 \cdot 10^3$	$0.62 \cdot 10^3$
M15	$11.2 \cdot 10^2$	$10.8 \cdot 10^2$	0	0	0	$2.20 \cdot 10^3$	$1.94 \cdot 10^3$
M16	$7.47 \cdot 10^2$	$7.18 \cdot 10^2$	0	$2.40 \cdot 10^2$	0	$1.70 \cdot 10^3$	$1.79 \cdot 10^3$
M17	0	0	$2.12 \cdot 10^2$	$8.19 \cdot 10^2$	0	$1.03 \cdot 10^3$	$1.05 \cdot 10^3$
M18	$5.60 \cdot 10^2$	0	$1.59 \cdot 10^2$	$1.80 \cdot 10^2$	$0.93 \cdot 10^2$	$0.99 \cdot 10^3$	$1.26 \cdot 10^3$
M19	$5.60 \cdot 10^2$	0	$1.69 \cdot 10^2$	$1.80 \cdot 10^2$	$0.93 \cdot 10^2$	$1.00 \cdot 10^3$	$1.21 \cdot 10^3$
M20	$5.60 \cdot 10^2$	0	$1.59 \cdot 10^2$	$1.05 \cdot 10^2$	$0.93 \cdot 10^2$	$0.92 \cdot 10^3$	$1.03 \cdot 10^3$
M21	0	0	0	0	$1.25 \cdot 10^3$	$1.25 \cdot 10^3$	$1.01 \cdot 10^3$
M22	0	0	0	$6.61 \cdot 10^2$	0	$0.66 \cdot 10^3$	$0.72 \cdot 10^3$
M23	$4.48 \cdot 10^2$	$4.31 \cdot 10^2$	$1.27 \cdot 10^2$	$3.75 \cdot 10^2$	$0.74 \cdot 10^2$	$1.46 \cdot 10^3$	$1.47 \cdot 10^3$
M25	0	0	$0.33 \cdot 10^2$	$5.28 \cdot 10^2$	0	$0.56 \cdot 10^3$	$0.54 \cdot 10^3$
M26	0	0	$1.35 \cdot 10^2$	$5.28 \cdot 10^2$	0	$0.66 \cdot 10^3$	$0.76 \cdot 10^3$
M27	0	0	0	$4.47 \cdot 10^2$	$8.45 \cdot 10^2$	$1.29 \cdot 10^3$	$1.42 \cdot 10^3$
M28	0	0	$9.44 \cdot 10^2$	0	$8.45 \cdot 10^2$	$1.79 \cdot 10^3$	$1.53 \cdot 10^3$
M30	$18.9 \cdot 10^2$	0	0	0	0	$1.89 \cdot 10^3$	$2.26 \cdot 10^3$

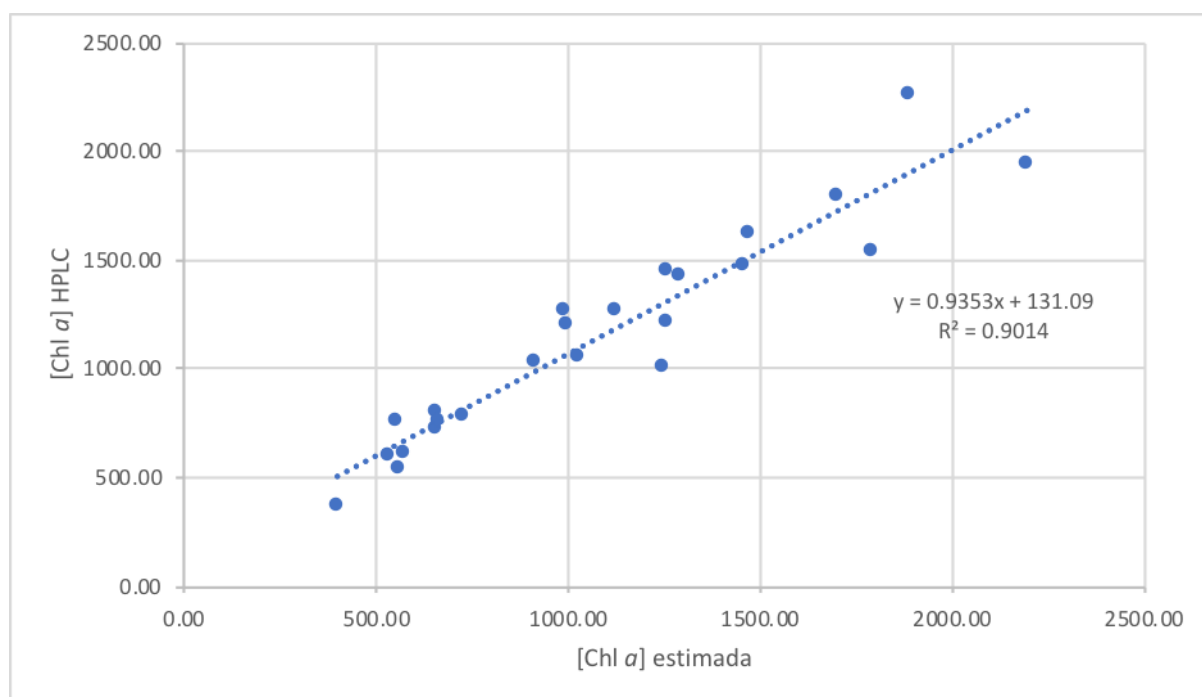


Figura 2.3 Relação entre a Chl *a* estimada e a concentração de Chl *a* obtida por análise de HPLC.

### 2.2.2. Microscopia

As monoculturas foram também analisadas para quantificação e medição das células, através de microscopia. A contagem das células (Tabela 2.5) foi feita com recurso ao microscópio ótico, em câmara de contagem Neubauer (volume de 0.0018 mL) ou Palmer-Maloney (volume de 0.1 mL), consoante as exigências da espécie (*e.g.* tamanho) ou da concentração da amostra (Guillard 1975). Para além da contagem foram recolhidas as biometrias de cada espécie para cálculos de biovolume (Tabela 2.6).

Foi também calculada, para caracterização das monoculturas, a Chl *a* por biovolume e Chl *a* por célula (Tabela 2.7), a partir da Chl *a* obtida por análise de HPLC. Para as misturas foi determinado o número de células e biovolume por litro (Tabela A2 e Tabela A3, em anexo), isto foi feito apenas para misturas que na sua composição em espécies tivessem informação completa ao nível de contagens e determinação de biovolume. Pode observar-se uma grande variabilidade de concentrações de Chl *a* por célula entre monoculturas, assim como grande diversidade de tamanhos e formas entre espécies intra- e inter- grupos. Desde células pequenas com elevada concentração de Chl *a* (*e.g.* espécie 10, *C. pelagicus*, que apresentou o maior rácio Chl *a*/ biovolume das espécies apresentada) a células grandes com pouca Chl *a* (*e.g.* espécie 29, *P. lunula*, é observada uma elevada concentração de Chl *a* por célula, aparentemente, no entanto, como o volume das células é também muito elevado, a razão Chl *a*: biovolume é a mais baixa das espécies utilizadas) (Tabela 2.7).

*Tabela 2.5 Contagem do número de células (Cél L<sup>-1</sup>) das monoculturas ao microscópio ótico. Número de células por litro para cada espécie e identificação da respetiva câmara de contagem. Espécies assinaladas como perdidas, correspondem a amostras que sofreram danos durante o transporte para o laboratório de microscopia.*

Monocultura	Câmara	Cél L <sup>-1</sup> (c/cc) (x 10 <sup>8</sup> )
6	Neubauer	2.05
13	Neubauer	1.1
28	Aglomerados	Aglomerados
21	Neubauer	74.4
4	Perdida	Perdida
12	Perdida	Perdida
25	Neubauer	42
32	Perdida	Perdida
35	Aglomerados	Aglomerados
3	Neubauer	1
8	Neubauer	6.8
20	Palmer-Maloney	0.06
26	Palmer-Maloney	0.06
29	Palmer-Maloney	0.03
31	Neubauer	0.4
10	Neubauer	0.85
19	Neubauer	73
15	Neubauer	9.15
34	Neubauer	7.45

Tabela 2.6 Biovolume ( $\mu\text{m}^3$ ) médio observado ao microscópio ótico e reportado na literatura para as diferentes monoculturas. Está também indicada a forma geométrica consideradas para o cálculo do biovolume, e respectiva referência.

Cultura	Biovolume médio observado ( $\mu\text{m}^3$ )	Forma Geométrica	Referência	Biovolume médio Literatura ( $\mu\text{m}^3$ )	Referência
Chloro 1 13	879	esfera prolate	Sun & Liu 2003	1126 - 1575	Norici, et al. 2002
Cyano 1 21	106	cilindro	Olenina, et al. 2006	1590	Olenina, et al. 2006
Dino 1 3	3483	elipsoide rotacional	Olenina, et al. 2006	7235	Olenina, et al. 2006
Dino 1 20	10367	elipsoide rotacional	Olenina, et al. 2006	14130	Olenina, et al. 2006
Dino 1 26	10257	elipsoide achatado	Olenina, et al. 2006	12953	Olenina, et al. 2006
Dino 1 29	245840	prisma em forma de foice	Sun & Liu 2003	20610	Guisande, e al. 2002
Dino 1 31	8487	cone+meia esfera	Sun & Liu 2003	6133	Olenina, et al. 2006
Hapto 1 10	442	esfera	Hillebrand, et al. 1999	635 - 1139	Price, et al. 1998
Hapto 3 19	31	esfera prolate	Hillebrand, et al. 1999	33.49	Phatarpekar, et al. 2000
Hapto 6 15	53	esfera	Olenina, et al. 2006	65	Olenina, et al. 2006

Tabela 2.7 Concentração de clorofila a por monocultura, obtida através de análise de HPLC e respectiva relação entre a Chl a e as abundâncias (Chl a/Cél) e o biovolume (Chl a/Biov).

Grupo	Monocultura	Chl a / L ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Chl a / Cel ( $\mu\text{g cel}^{-1}$ )	Chl a / Biov ( $\mu\text{g } \mu\text{m}^{-3}$ )
<b>Chloro1</b>	13	$22.4 \cdot 10^2$	$2.04 \cdot 10^{-5}$	$23.2 \cdot 10^{-9}$
<b>Cyano1</b>	21	$21.5 \cdot 10^2$	$0.03 \cdot 10^{-5}$	$2.73 \cdot 10^{-9}$
<b>Dino1</b>	3	$10.7 \cdot 10^2$	$1.07 \cdot 10^{-5}$	$3.07 \cdot 10^{-9}$
<b>Dino1</b>	20	$4.36 \cdot 10^2$	$7.62 \cdot 10^{-5}$	$7.35 \cdot 10^{-9}$
<b>Dino1</b>	26	$7.19 \cdot 10^2$	$11.6 \cdot 10^{-5}$	$11.3 \cdot 10^{-9}$
<b>Dino1</b>	29	$4.18 \cdot 10^2$	$12.2 \cdot 10^{-5}$	$0.50 \cdot 10^{-9}$
<b>Dino1</b>	31	$18.7 \cdot 10^2$	$4.68 \cdot 10^{-5}$	$5.52 \cdot 10^{-9}$
<b>Dino:</b>		$9.03 \cdot 10^2$	$7.43 \cdot 10^{-5}$	$5.55 \cdot 10^{-9}$
		$6.04 \cdot 10^2$	$4.70 \cdot 10^{-5}$	$4.13 \cdot 10^{-9}$
<b>Hapto1</b>	10	$10.8 \cdot 10^2$	$1.27 \cdot 10^{-5}$	$28.8 \cdot 10^{-9}$
<b>Hapto3</b>	19	$23.0 \cdot 10^2$	$0.03 \cdot 10^{-5}$	$10.0 \cdot 10^{-9}$
<b>Hapto6</b>	15	$3.70 \cdot 10^2$	$0.04 \cdot 10^{-5}$	$7.66 \cdot 10^{-9}$
<b>Hapto:</b>		$12.5 \cdot 10^2$	$0.45 \cdot 10^{-5}$	$15.5 \cdot 10^{-9}$
		$9.75 \cdot 10^2$	$0.71 \cdot 10^{-5}$	$11.6 \cdot 10^{-9}$

### 2.3. Quimiotaxonomia através de análise HPLC-CHEMTAX

A análise quimiotaxonómica, através de análise HPLC-CHEMTAX, utiliza um processo iterativo de factorização matricial de modo a otimizar a associação entre os diferentes pigmentos presentes, permitindo a determinação dos grupos taxonómicos (Mackey et al. 1997). Esta ferramenta baseia-se na construção de uma matriz de rácios de pigmentos (em relação à Chl *a*), para cada grupo fitoplanctónico, otimizada a partir de uma dada matriz de *input*. Na matriz, cada linha representa um grupo, e cada coluna os pigmentos reconhecidos como necessários à identificação dos grupos, como apresentado no exemplo da Tabela 2.8.

*Tabela 2.8 Exemplo de matriz de input, contendo três grupos e quatro pigmentos característicos aos mesmos que permitirão a distribuição da Chl *a* por parte do programa CHEMTAX. Cada linha representa um grupo/classe identificado como presente nas amostras e cada coluna os rácio pigmento/Chl *a* a utilizar na sua identificação.*

	Pigmento_A	Pigmento_B	Pigmento_C	Pigmento_D	Chla
Grupo_1	0.0	0.3	0.0	0.7	1
Grupo_2	0.2	0.4	0.2	0.2	1
Grupo_3	0.0	0.1	0.8	0.1	1

O número de colunas (pigmentos) deve ser sempre superior ao número de linhas (grupos), sendo que é o utilizador que define os grupos e pigmentos a constar na matriz. Esta matriz tem de ser ajustada à área de estudo, considerando as espécies existentes e as condições ambientais, pois espécies diferentes apresentarão diferentes concentrações de pigmentos e condições ambientais distintas provocam alterações no estado fisiológico da célula, com consequente impacto nos pigmentos. No entanto, a definição desta matriz está dependente da experiência do utilizador e do conhecimento prévio da região. A partir da matriz de rácios otimizada, matriz de *output* final, o CHEMTAX aplica a proporção final ao total de Chl *a* em cada amostra para determinar a proporção de concentração de Chl *a* atribuída a cada grupo fitoplanctónico. Assim, a análise quimiotaxonómica permite estimar a concentração de Chl *a* associada a cada grupo fitoplanctónico para cada amostra.

Neste trabalho, a análise HPLC-CHEMTAX foi aplicada a 24 misturas, descritas na secção anterior (Tabela 2.2). A análise quimiotaxonómica (HPLC-CHEMTAX) foi realizada com recurso ao programa CHEMTAX (Mackey et al. 1996), versão 1.9.5. Para além da matriz de rácios *input*, o programa requer uma matriz de dados, exemplo Tabela 2.9, isto é, a informação da composição pigmentar de cada amostra.

*Tabela 2.9 Exemplo de uma matriz de dados contendo três amostras com a concentração de cinco pigmentos obtidos a partir da análise de HPLC*

	Pigmento_A	Pigmento_B	Pigmento_C	Pigmento_D	Chla
Amostra_1	0.0	365.1	0.0	851.9	1217.0
Amostra_2	160.0	320.0	160.0	160.0	800.0
Amostra_3	0.0	35.9	287.2	35.9.0	359.0

É importante referir que não foram feitas alterações aos parâmetros de factorização utilizados para cada teste, isto é, foram utilizadas as formatações padrão do programa, de forma a manter a consistência entre as diferentes análises. Os resultados são apresentados em quantidades absolutas de Chl *a* ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), assim como em concentrações relativas do total de Chl *a* (%) por amostra, atribuídas a cada grupo fitoplanctónico.

Em resumo, os resultados desta análise quimiotaxonómica estão dependentes da informação inicial que é dada, nomeadamente, dos rácios, dos pigmentos e dos grupos considerados na matriz de *input*. De forma a testar o impacto da variação destes fatores no resultado final, foram feitas 1) variações na matriz de input (isto é, pigmentos e grupos); e 2) variações no modo de obtenção da

matriz de *output* (isto é, abordagens). Foram utilizadas como matrizes de *input* principal as matrizes apresentadas na Tabela 2.13 e Tabela 2.14, para cada Abordagem (2.3.1), e nestas foram feitas alterações quanto à origem dos rácios (2.3.2), aos pigmentos (2.3.3) e aos grupos (2.3.4). Na Figura 2.4 são representadas esquematicamente as variações e sobre que ponto estas são efetuadas.

#### 1) Variações na matriz de *input*



#### 2) Variações no modo de obtenção da matriz de *output*



Figura 2.4 Esquema das variações aos fatores influentes ao executar o programa CHEMTAX, nomeadamente: verde, variação de abordagem; roxo, variação de rácio; laranja, variação de Pigmentos; rosa, variação de grupo. Para cada abordagem foram feitas alterações quanto aos pigmentos, grupos e origem de rácios introduzidos na matriz de input.

##### 2.3.1. Variação de grupos utilizados na matriz de *input*

Na matriz de *input* são considerados os grupos fitoplanctónicos presentes na amostra, no entanto, os métodos que melhor permitem identificá-los, como análise ao microscópio, e/ou citometria de fluxo têm as suas próprias limitações. A título de exemplo, a microscopia apenas permite analisar a fração de células de maiores dimensões, levando a uma sobrestimação destes grupos. Sendo assim, é geralmente utilizada para a tomada de decisão uma mistura de conhecimento bibliográfico da região amostrada com a análise crítica da lista de pigmentos obtida por HPLC para as amostras em questão.

Neste estudo, para testar a importância deste conhecimento *a priori* sobre os grupos presentes na amostra, fez-se variar a constituição dos grupos na matriz de *input* de acordo com seis grupos (G), descrito na Tabela 2.10. Para a determinação dos grupos a variar foram construídos dendrogramas, Figura 2.5, feita com recurso ao programa estatístico Primer 6 & Permanova+ (Clarke & Gorley 2006, Anderson et al. 2008), que permitem analisar quais as espécies mais similares a nível de composição e concentração pigmentar. Aqui podemos visualizar que as espécies se agrupam corretamente por *taxa* através do padrão pigmentar. No entanto, ocorrem falhas neste agrupamento quando estas têm pigmentos partilhados com semelhante rácio Chl *a*/pigmento, essencialmente a nível das Hapto e Chloro+Prasino.

Tabela 2.10 Variação de Grupos. Cada linha corresponde a um conjunto de grupos utilizado em cada teste. Coluna 3 indica o número de classes utilizadas.

		Nº de Classes
G1	[Chloro1]; [Chloro2]; [Cyano1]; [Diatom1]; [Dino1]; [Hapto1]; [Hapto3]; [Hapto6]; [Prasino2]	9
G2	[Chloro1+Chloro2]; [Cyano1]; [Diatom1]; [Dino1]; [Hapto1+Hapto3+Hapto6]; [Prasino2]	6
G3	[Chloro1+Chloro2+Prasino2]; [Cyano1]; [Diatom1]; [Dino1]; [Hapto1+Hapto3+Hapto6]	5
G4	[Chloro1+Chloro2]; [Cyano1]; [Diatom1]; [Dino1]; [Hapto1]; [Hapto3]; [Hapto6]; [Prasino2]	8
G5	[Chloro1+Chloro2+Prasino2]; [Cyano1]; [Diatom1]; [Dino1]; [Hapto1]; [Hapto3]; [Hapto6]	7
G6	[Chloro1]; [Chloro2]; [Cyano1]; [Diatom1]; [Dino1]; [Hapto1+Hapto3+Hapto6]; [Prasino2]	7

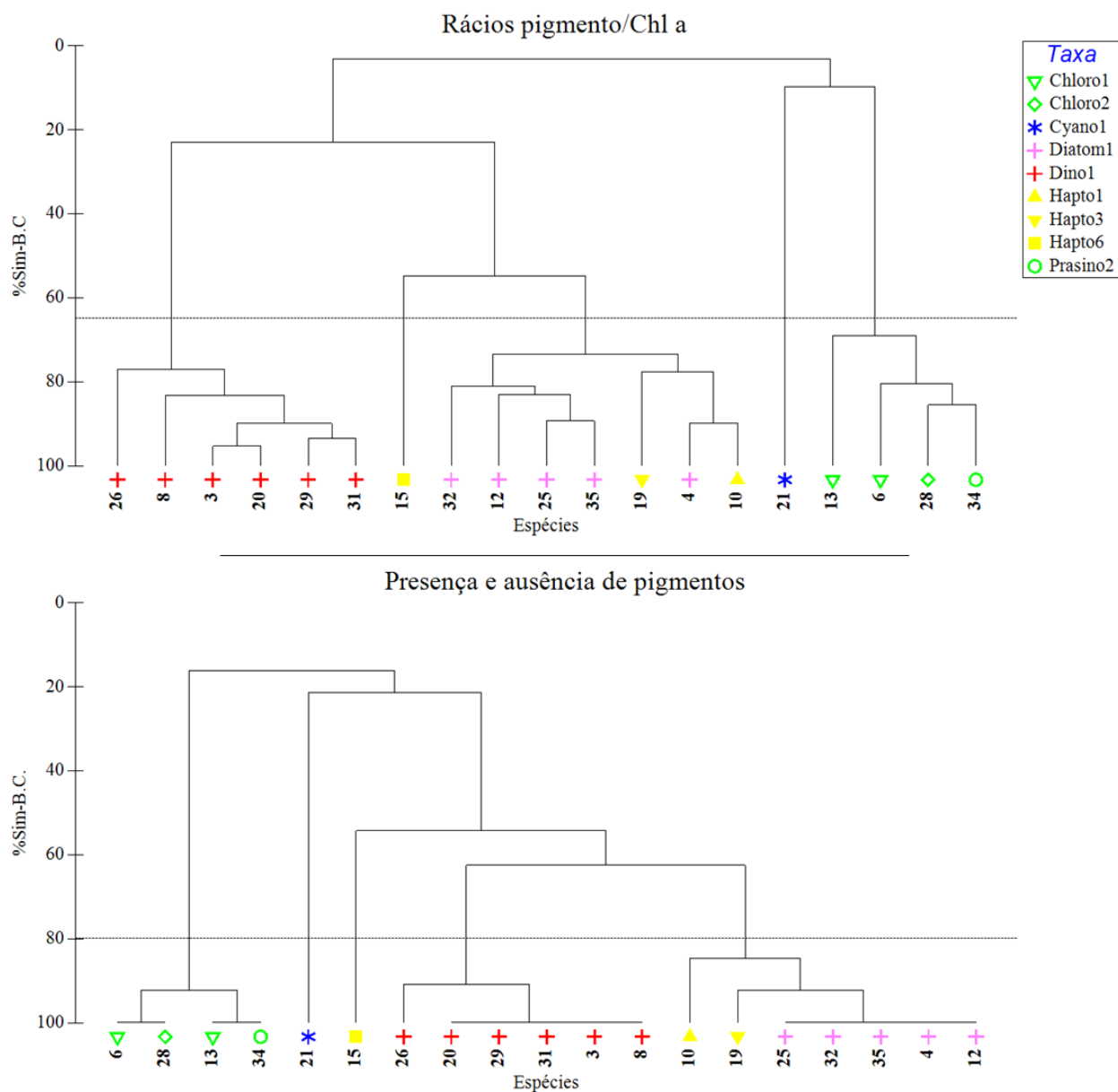


Figura 2.5 Dendrogramas construídos a partir de uma matriz de similaridade de Bray-Curtis, utilizando como método de agregação o critério de Group Average. Em baixo com dados de presença e ausência de pigmentos e em cima com dados de rácios pigmento/Chl *a* obtidos a partir da Tabela 2.3. Aqui podemos visualizar que as espécies se agrupam corretamente por taxa através do padrão pigmentar, no entanto, ocorrem falhas neste agrupamento quando estas têm pigmentos partilhados com semelhante rácio Chl *a*/pigmento.

Em G1 foram mantidos todos os *taxa* utilizados nas misturas, por outro lado em G3 foram mantidos apenas os grupos principais. Os grupos Chloro 1, Chloro 2, e Prasino 2 são aqueles que apresentam maiores semelhanças, sendo geralmente de difícil separação, por isso estes grupos foram combinados de formas diferentes. Também os grupos Hapto 1, Hapto 3 e Hapto 6 são combinados de diversas formas, no entanto, por se apresentar o grupo taxonómico mais distinto, isto é, o grupo Hapto devido essencialmente à presença das Hapto 6 (com os pigmentos Chl *c3* e Hex-*k*Fuco), é o que apresenta diferenças internas mais marcadas quanto à composição pigmentar. Apesar do valor de rácio pigmento/Chl *a* das Hapto e Diatom as aproximar, tendo em conta a sua composição pigmentar, são mantidas, geralmente, em separado, não sendo por isso incluídas em conjunto nesta análise. Para além disso, são ecologicamente muito distintas sendo a avaliação da sua correcta separação muito relevante.

### 2.3.2. Variação de pigmentos utilizados na matriz de *input*

A partir da análise em HPLC das misturas foram identificados e quantificados 26 pigmentos, nomeadamente, Chl *c*3, Chl *c*2, Chl *c*1, Peri, But-Fuco, Fuco, Neo, Hex-*k*fuco, Viola, Myxo, Hex-fuco, Diadino, Dinoox, Diato, Zea, Lut, Chl *b*, Echin, Chl *c*2 MGDG,  $\beta\epsilon$ -Car,  $\beta\beta$ -Car, Chl *a*. Para a análise em HPLC-CHEMTAX é necessário escolher aqueles que permitem uma melhor identificação dos grupos. Para isso há que ter em conta: i) a distribuição dos pigmentos nos grupos, isto é, se são pigmentos únicos ou amplamente distribuídos nos grupos (Tabela 2.11); ii) a variação da concentração dos pigmentos, ou seja, se a concentração de determinado pigmento varia entre espécies ou grupos, e entre exemplares da mesma espécie; iii) a existência de pigmentos que podem ter as suas concentrações alteradas em reflexo das condições ambientais, i.e. que se podem converter noutros, como pigmentos foto-protetores; e iv) a existência de pigmentos difíceis de identificar por análise de HPLC, devido à sua baixa concentração, semelhança no tempo de saída e/ou espectro com outros pigmentos. A variação pigmentar dentro de cada grupo está representada na Tabela 2.12, através da média e desvio padrão do rácio de pigmentos.

Para avaliar a influência da escolha dos pigmentos no resultado final, dos 26 pigmentos foram selecionadas diferentes combinações, nomeadamente, três conjuntos: i) todos os pigmentos (tP), utilizando-se todos os pigmentos para os quais havia informação pigmentar obtida por HPLC; ii) sem pigmentos de confundimento (sC), onde foram retirados os pigmentos Diadino, Diato e  $\beta\beta$ -Car; e iii) sem pigmentos minoritários (sM), excluindo-se da análise os pigmentos Hex-*k*fuco, Myxo, Echin e Chl *c*2 MGDG.

Os pigmentos de confundimento (sC) foram escolhidos tendo em conta o fator de erro que estes poderiam provocar na análise. Estes pigmentos são partilhados pela maioria dos grupos (Tabela 2.11), e podem variar significativamente a sua quantidade em resposta a variações na luminosidade devido à sua função foto-protetora.

Os pigmentos minoritários (sM) foram selecionados pois são pigmentos que aparecem em baixa concentração, mas que, apesar de serem potencialmente úteis quimiotaxonomicamente, pois são geralmente pouco partilhados, nem todos os métodos de HPLC têm resolução suficiente para permitir a sua separação, já que as suas baixas concentrações tornam difícil a sua identificação e quantificação. Considerando este grupo, poderemos avaliar a relevância destes pigmentos minoritários no resultado final.

Tabela 2.11 Representação dos pigmentos presentes em cada grupo. A vermelho estão assinalados os pigmentos não partilhados, únicos ao grupo.

	Chl <i>c</i> 3	Chl <i>c</i> 2	Chl <i>c</i> 1	Peri	But-fuco	Fuco	Neo	Hex- <i>k</i> fuco	Viola	Myxo	Hex-fuco	Diadino	Dinox	Diato	Zea	Lut	Chl <i>b</i>	Echin	Chl <i>c</i> 2 MGDG	$\beta\epsilon$ -Car	$\beta\beta$ -Car	Chl <i>a</i>
Chloro1							•		•						•	•	•			•	•	•
Chloro2							•		•						•	•	•			•	•	•
Cyano1										•								•			•	•
Diatom1		•	•			•						•		•							•	•
Dino1		•		•								•	•	•							•	•
Hapto1		•	•		•	•					•	•		•							•	•
Hapto3		•	•			•						•		•					•		•	•
Hapto6	•	•			•	•		•			•	•		•					•	•	•	•
Prasino2							•		•						•	•	•				•	•

Tabela 2.12 Rácios médios pigmento/Chl a e desvio padrão por grupo.

	Cultura	Chl c3	Chl c2	Chl c1	Peri	But-fuco	Fuco	Neo	Hex-kfuco	Viola	Myxo	Hex-fuco	Diadino	Dino	Diato	Zea	Lut	Chl b	Echin	Chl c2 MGDG	βc-Car	ββ-Car	Chl a
<b>Chloro1</b>	6	0	0	0	0	0	0	0.062	0	0.024	0	0	0	0	0	0.001	0.180	0.492	0	0	0.023	0.027	1.000
	13	0	0	0	0	0	0	0.043	0	0.045	0	0	0	0	0	0.006	0.117	0.323	0	0	0	0.120	1.000
<b>Chloro2</b>	28	0	0	0	0	0	0	0.053	0	0.062	0	0	0	0	0	0.006	0.029	0.611	0	0	0.015	0.027	1.000
<b>Média Chloro</b>		0	0	0	0	0	0	0.053	0	0.044	0	0	0	0	0	0.004	0.109	0.475	0	0	0.013	0.058	1.000
<b>Desvio padrão</b>		0	0	0	0	0	0	0.010	0	0.019	0	0	0	0	0	0.003	0.076	0.145	0	0	0.012	0.054	
<b>Cyano1</b>	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.079	0	0	0	0	0	0	0	0.058	0	0	0.089	1.000
<b>Diatom1</b>	4	0	0.038	0.091	0	0	0.480	0	0	0	0	0	0.095	0	0.009	0	0	0	0	0	0	0.033	1.000
	12	0	0.165	0.083	0	0	0.718	0	0	0	0	0	0.058	0	0.004	0	0	0	0	0	0	0.027	1.000
	25	0	0.080	0.062	0	0	0.554	0	0	0	0	0	0.156	0	0.003	0	0	0	0	0	0	0.026	1.000
	32	0	0.320	0.125	0	0	0.582	0	0	0	0	0	0.105	0	0.013	0	0	0	0	0	0	0.024	1.000
	35	0	0.070	0.101	0	0	0.665	0	0	0	0	0	0.167	0	0.031	0	0	0	0	0	0	0.021	1.000
<b>Média Diatom</b>		0	0.135	0.092	0	0	0.600	0	0	0	0	0	0.116	0	0.012	0	0	0	0	0	0	0.026	1.000
<b>Desvio padrão</b>		0	0.114	0.023	0	0	0.094	0	0	0	0	0	0.045	0	0.011	0	0	0	0	0	0	0.004	
<b>Dino1</b>	3	0	0.240	0	0.548	0	0	0	0	0	0	0	0.100	0.050	0.003	0	0	0	0	0	0	0.032	1.000
	8	0	0.385	0	0.450	0	0	0	0	0	0	0	0.150	0.027	0.009	0	0	0	0	0	0	0.026	1.000
	20	0	0.249	0	0.494	0	0	0	0	0	0	0	0.083	0.052	0.006	0	0	0	0	0	0	0.033	1.000
	26	0	0.394	0	0.981	0	0	0	0	0	0	0	0.155	0.045	0	0	0	0	0	0	0	0.023	1.000
	29	0	0.244	0	0.695	0	0	0	0	0	0	0	0.112	0.038	0.004	0	0	0	0	0	0	0.023	1.000
	31	0	0.285	0	0.614	0	0	0	0	0	0	0	0.105	0.036	0.001	0	0	0	0	0	0	0.018	1.000
<b>Média Dino</b>		0	0.300	0	0.630	0	0	0	0	0	0	0	0.118	0.041	0.004	0	0	0	0	0	0	0.026	1.000
<b>Desvio padrão Dino</b>		0	0.072	0	0.193	0	0	0	0	0	0	0	0.029	0.009	0.003	0	0	0	0	0	0	0.006	
<b>Hapto1</b>	10	0	0.049	0.074	0	0.001	0.388	0	0	0	0	0.001	0.084	0	0.016	0	0	0	0	0	0	0.033	1.000
<b>Hapto3</b>	19	0	0.056	0.044	0	0	0.307	0	0	0	0	0	0.192	0	0.014	0	0	0	0	0.014	0	0.029	1.000
<b>Hapto6</b>	15	0.346	0.239	0	0	0.026	0.723	0	0.150	0	0	0.099	0.098	0	0.004	0	0	0	0	0.068	0.007	0.016	1.000
<b>Média Hapto</b>		0.115	0.115	0.039	0	0.009	0.473	0	0.050	0	0	0.033	0.125	0	0.011	0	0	0	0	0.027	0.002	0.026	1.000
<b>Desvio padrão Hapto</b>		0.200	0.108	0.037	0	0.015	0.221	0	0.087	0	0	0.057	0.059	0	0.006	0	0	0	0	0.036	0.004	0.009	
<b>Prasino2</b>	34	0	0	0	0	0	0	0.075	0	0.073	0	0	0	0	0	0.003	0.145	0.681	0	0	0	0.053	1.000



### 2.3.3. Variação da origem dos rácios na matriz de *input*

Uma vez que os valores dos rácios de pigmentos é uma das questões mais importantes ao nível das matrizes de *input* utilizadas nestas análises de quimiotaquonomia, para que ocorra uma correta alocação da concentração de Chl *a* a cada grupo de fitoplâncton, é fundamental fornecer rácios que sejam o mais fidedigno possível. Teoricamente, para obter os rácios mais realistas, deveríamos proceder ao cultivo de espécies do local em estudo, de forma a obter uma matriz de rácios o mais ajustada possível. No entanto, seria sempre difícil recriar as condições ambientais existentes no período antes da colheita da comunidade fitoplanctónica, além de que este passo iria requerer um operador experiente, aumentando o custo e tempo de execução. Por este motivo são geralmente utilizados rácios já otimizados em estudos anteriores o mais próximo possível da área em estudo.

Para avaliar o impacto da origem/fonte dos rácios nos resultados obtidos, foram consideradas duas matrizes de *input*, nomeadamente: i) matriz de *input* com os rácios obtidos através da relação pigmento/Chl *a* das monoculturas (Cult.); e ii) matriz de *input* com os rácios de culturas obtidos através de pesquisa bibliográfica (Lit). Estas matrizes estão representadas na Tabela 2.13 e Tabela 2.14, respetivamente. Para a matriz Cult, os valores apresentados foram obtidos através da média dos rácios entre pigmento e Chl *a* de cada espécie pertencente a cada grupo (Tabela 2.12). Para a matriz *input* Lit os rácios de pigmento/Chl *a* foram compilados a partir de composições de pigmento de HPLC publicadas de uma ampla variedade de culturas de fitoplâncton marinho (representativas das espécies usadas nas misturas).

Tabela 2.13 Matriz de input para CHEMTAX construída com base nos rácios pigmento/Chl a obtidos nas monoculturas analisadas.

	Chl c3	Chl c2	Chl c1	Peri	But-fuco	Fuco	Neo	Hex-kfuco	Viola	Myxo	Hex-fuco	Diadino	Dinox	Diato	Zea	Lut	Chl b	Echin	Chl c2 MGDG	$\beta\epsilon$ -Car	$\beta\beta$ -Car	Chl a
Chloro1	0	0	0	0	0	0	0.048	0	0.039	0	0	0	0	0	0.005	0.135	0.370	0	0	0.006	0.094	1
Chloro2	0	0	0	0	0	0	0.053	0	0.062	0	0	0	0	0	0.006	0.029	0.611	0	0	0.015	0.027	1
Cyano1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.079	0	0	0	0	0	0	0	0.058	0	0	0.089	1
Diatom1	0	0.082	0.082	0	0	0.563	0	0	0	0	0	0.121	0	0.009	0	0	0	0	0	0	0.028	1
Dino1	0	0.316	0	0.590	0	0	0	0	0	0	0	0.123	0.038	0.004	0	0	0	0	0	0	0.025	1
Hapto1	0	0.049	0.074	0	0.001	0.388	0	0	0	0	0.001	0.084	0	0.016	0	0	0	0	0	0	0.033	1
Hapto3	0	0.056	0.044	0	0	0.307	0	0	0	0	0	0.192	0	0.014	0	0	0	0	0.014	0	0.029	1
Hapto6	0.346	0.239	0	0	0.026	0.723	0	0.150	0	0	0.099	0.098	0	0.004	0	0	0	0	0.068	0.007	0.016	1
Prasino2	0	0	0	0	0	0	0.075	0	0.073	0	0	0	0	0	0.003	0.145	0.681	0	0	0	0.053	1

Chloro1 – *Chlorococcum submarinum*, *Dunaliella salina*; Chloro2 – *Pseudostichococcus monallantoides*; Cyano1 – *Nodularia harveyana*; Diatom1 – *Halaphora coffeaeformis*, *Ditylum brightwellii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Thalassiosira pseudonana*; Dino1 – *Alexandrium minutum*, *Amphidinium carterae*, *Lingulodinium polyedrum*, *Prorocentrum micans*, *Pyrocystis lunula*, *Scrippsiella trochoidea*; Hapto1 – *Coccolithus pelagicus*; Hapto3 – *Isochrysis galbana*; Hapto6 – *Emiliana huxleyi*; Prasino2 – *Tetraselmis chuii*

Tabela 2.14 Matriz de input para CHEMTAX construída com base nos rácios pigmento/Chl a de culturas encontrados na literatura.

	Chl c3	Chl c2	Chl c1	Peri	But-fuco	Fuco	Neo	Hex-kfuco	Viola	Myxo	Hex-fuco	Diadino	Dinox	Diato	Zea	Lut	Chl b	Echin	Chl c2 MGDG	$\beta\epsilon$ -Car	$\beta\beta$ -Car	Chl a
Chloro1	0	0	0	0	0	0	0.066	0	0.049	0	0	0	0	0	0.032	0.171	0.315	0	0	0	0.033	1
Chloro2	0	0	0	0	0	0	0.08	0	0.047	0	0	0	0	0	0	0.178	0.73	0	0	0	0.046	1
Cyano1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0.12	0	0	0	0	0.143	0	0	0.066	0	0	0.065	1
Diatom1	0	0.045	0.023	0	0	0.623	0	0	0.009	0	0	0.163	0	0.054	0.021	0	0	0	0	0	0.026	1
Dino1	0	0.218	0	0.558	0	0	0	0	0	0	0	0.253	0.054	0.046	0	0	0	0	0	0	0.026	1
Hapto1	0	0.042	0.061	0	0	0.306	0	0	0	0	0	0.337	0	0.017	0	0	0	0	0	0	0.064	1
Hapto3	0	0.163	0.066	0	0	0.347	0	0	0	0	0	0.179	0	0.025	0	0	0	0	0.032	0	0.046	1
Hapto6	0.177	0.209	0	0	0.005	0.229	0	0.137	0	0	0.47	0.137	0	0.047	0	0	0	0	0.087	0.013	0.026	1
Prasino2	0	0	0	0	0	0	0.045	0	0.056	0	0	0	0	0	0.035	0.067	0.799	0	0	0.027	0.167	1

Cyano1<sup>1</sup>: *Aphanizomenon flos-aquae*, *Oscillatoria sp.*, *Trichodesmium sp.*; Chloro1<sup>1</sup>: *Dunaliella tertiolecta*; Prasino2<sup>1</sup>: *Pyramimonas parkeae*, *Tetraselmis spp.*; Diatom1<sup>1</sup>: *Chaetoceros didymus*; Hapto1<sup>1</sup>: *Pavlova lutheri*; Hapto3<sup>1</sup>: *Dicrateria inornata*; Hapto6<sup>1</sup>: *Emiliana huxleyi*; Dino1<sup>1</sup>: *Amphidinium carterae*; Chloro2<sup>2</sup>: *Chlamydomonas cf. Coccoideis*

<sup>1</sup> (Higgins et al. 2011); <sup>2</sup>(Laza-Martinez et al. 2007)

#### 2.3.4. Variação na abordagem a realizar na análise quimiotaconómica

Foram testadas 3 abordagens, isto é, três formas diferentes de obter o resultado otimizado a partir da análise HPLC-CHEMTAX, nomeadamente: i) abordagem proposta por Wright et al. (2009) (W); ii) abordagem proposta por Latasa (2007) (L); iii) e uma abordagem que combina as duas mencionadas anteriormente, utilizada inicialmente por Higgins et al. (2011) e Mendes et al. (2011) (WL). A diferença entre abordagens centra-se essencialmente no número de corridas efetuadas, sendo cada corrida um conjunto de X iterações, em que o erro quadrado médio (RMS) vai diminuindo, até estabilizar num valor mínimo que corresponderá (em teoria) à melhor associação entre a matriz de rácios otimizada e os dados de pigmentos das amostras fornecidos.

Na abordagem W a partir da matriz de *input* principal (Tabela 2.13 ou Tabela 2.14) são criadas 60 matrizes aleatórias, isto é, cada rácio é variado aleatoriamente multiplicando cada célula por um fator F (equação 2.1).

$$F = 1 + S \times (R - 0.5)$$

2.1

Onde S é fator de escala, 0.7; e R é um valor aleatório entre 0 e 1 (gerado aleatoriamente usando o programa *Excel*). Estas 60 matrizes são utilizadas como matriz de *input*. Das 60 corridas, é feita a média das seis matrizes de *output* com menor RMS, e é esta média que é utilizada como resultado final para esta abordagem.

Na abordagem L introduz-se uma matriz de *input* (Tabela 2.13 ou Tabela 2.14) que gera uma matriz de *output* que servirá de *input* à corrida seguinte, este processo é repetido cerca de 15 vezes até a estabilização dos rácios.

Na abordagem WL as seis matrizes com menor RMS obtidas da abordagem W são introduzidas como *input*, e as seis obtidas como *output* servirão como matrizes de *input* nas corridas seguintes, tal como acontece na abordagem L, este processo é repetido 15 vezes, até que os rácios estabilizem. Nesta última abordagem o resultado final é a média das últimas seis execuções, após as quinze corridas.

Importa notar que em L e WL são efetuadas corridas sucessivas, sendo cada matriz de *input* uma matriz de *output* otimizada pelo próprio CHEMTAX, ao contrário do que acontece na abordagem W, em que as 60 matrizes de *output* são geradas previamente, a qualquer otimização por parte do programa.

#### 2.4. Análise de Dados

Os dados foram analisados de duas formas, nomeadamente: i) de forma geral, isto é, todas as variações analisadas em conjunto; e ii) por variação de Grupo. Esta análise permite detetar erros na distribuição interna por parte do CHEMTAX nos diferentes Grupos criados.

Para se fazer a comparação dos resultados obtidos pelos diferentes testes, de forma geral, foi necessário uniformizar o número de grupos a comparar, tendo-se somado os valores, sempre que necessário, de modo a obter-se o número mínimo de grupos, ou seja, de modo a ter-se apenas as classes correspondentes ao G3 (N=5, Tabela 2.10), nomeadamente:

Chloro+Prasino	[Chloro1+Chloro2+Prasino2]
Hapto	[Hapto1+Hapto3+Hapto6]
Cyano	[Cyano1]
Diatom	[Diatom1]
Dino	[Dino1]

Os resultados foram analisados através de gráficos de barra, que permitem comparar diretamente a resposta às variações provocadas nas matrizes por mistura e através do cálculo das diferenças médias por teste e o valor estimado de concentração de Chl *a*. Foram calculados os valores de similaridade de Bray-Curtis entre os valores obtidos de Chl *a* do CHEMTAX, e o valor teórico esperado de Chl *a* para cada grupo por mistura. Deste valor foi calculada a média, máximo, mínimo, e desvio padrão por teste, e representados através de Caixa de Bigodes, sendo considerados os melhores resultados de teste aqueles que apresentavam maior média por teste e menor desvio padrão. O valor médio de Similaridade de Bray-Curtis obtido para cada teste foi analisado numa análise de componente principais (PCA). Para além disso, foi também calculada a correlação de Pearson entre o valor absoluto e relativo de [Chl *a*] estimado para cada Grupo e os valores obtidos através da análise CHEMTAX, e a correlação de Pearson para os valores de Similaridade de Bray Curtis entre misturas de modo a saber para qual grupo se obtém um melhor desempenho do programa CHEMTAX.

Para uma análise mais detalhada à variação de grupos, foram analisados os grupos sem uniformizar. Esta análise permitirá ao comparar com a análise geral saber não só se a Chl *a* está a ser distribuída de forma correta pelos *taxa* de maior ordem como também se esta distribuição é internamente bem feita. Esta análise foi efetuada apenas através de correlação Pearson.

A análise foi feita com recurso aos programas Excel, Primer 6 & Permanova+ (Clarke & Gorley 2006, Anderson et al. 2008) e R(R Development Core Team 2019) com o intuito de comparar os 108 testes (variações) realizados para as 24 misturas, anteriormente apresentadas (Tabela 2.2).

# Capítulo 3

**Resultados**

Neste capítulo são apresentados os resultados das 108 análises HPLC-CHEMTAX obtidos a partir de uma base de dados de pigmentos de 24 misturas fitoplanctónicas, como descrito no capítulo anterior. Para estas análises, 4 fatores foram considerados: i) os grupos selecionados para a matriz de rácios de *input*; ii) os pigmentos selecionados para a matriz de rácios de *input*; iii) a origem dos rácios de pigmentos (culturas literatura vs culturas *in situ*); e iv) a abordagem utilizada para estabilização de rácios. Inicialmente foi feita uma análise direta dos resultados obtidos para cada um dos testes por mistura analisando-se a proporção de Chl *a* atribuída a cada mistura pelas diversas variações efetuadas (3.1), isto é, são apresentados exemplos do padrão de variação dos resultados para cada uma das misturas. De seguida, são apresentadas as diferenças (3.2), as correlações (3.3) entre os resultados das várias análises HPLC-CHEMTAX e os resultados esperados. Na secção 3.4 são apresentados os valores de Similaridades de Bray-Curtis entre os resultados das análises HPLC-CHEMTAX e o valor de Chl *a* estimado para a composição de cada mistura. Por fim, na secção 3.5 todos os resultados são integrados com auxílio a uma análise de ordenação (Análise de componentes principais), cujo objetivo é o de simplificar a complexidade do conjunto de dados, mostrando os padrões mais relevantes, neste caso, identificando os fatores que explicam a variabilidade dos dados.

### 3.1 Resultados diretos da metodologia HPLC-CHEMTAX

A Figura 3.1 apresenta exemplos dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados, considerando cada uma das 24 misturas. Os exemplos selecionados pretendem ilustrar os padrões dos resultados observados, agrupados e sumarizados na Tabela 3.1. A representação completa dos resultados, para cada um dos testes é apresentada em anexo, na Figura A1. Nestas figuras podem comparar-se os resultados dos vários testes com o valor estimado de proporção em Chl *a* para cada uma das misturas. A variação dos resultados obtidos com os diversos testes com o CHEMTAX é claramente visível, bem como o surgimento de grupos não esperados de forma recorrente em todos os testes para todas as misturas. De um modo geral, as maiores variações são associadas à estimativa das Hapto, Diatom e Cyano.

Por exemplo, em relação à M27 (Figura 3.1), que apenas deveria conter Hapto (cerca de 65%) e Dino (cerca de 35%), dependendo do teste aplicado, podem obter-se todos os *taxa* utilizados, sendo que em G2, G3 e G6 as Hapto tornam-se minoritárias e são substituídas por Diatom, ou seja, verifica-se uma subestimação das Hapto e uma sobrestimação das Diatom para estes grupos.

Considerando os resultados por padrões de semelhança (Tabela 3.1), verificam-se resultados inversos nos Conjunto 1 (*e.g.* M14, M26) e Conjunto 2, (*e.g.* M8, M27), isto é, no Conjunto 1 ocorreu sobrestimação de Hapto em G1, G4, e G5 e subestimação de Diatom nos restantes testes, por outro lado no Conjunto 2 ocorreu sobrestimação de Diatom em G2, G3, e G6 e subestimação de Hapto nos restantes testes. Nos restantes Conjuntos (3-8) ocorre a sobrestimação das Cyano por testes Cult (usando os rácios das culturas) e subestimação por testes Lit (rácios da literatura).

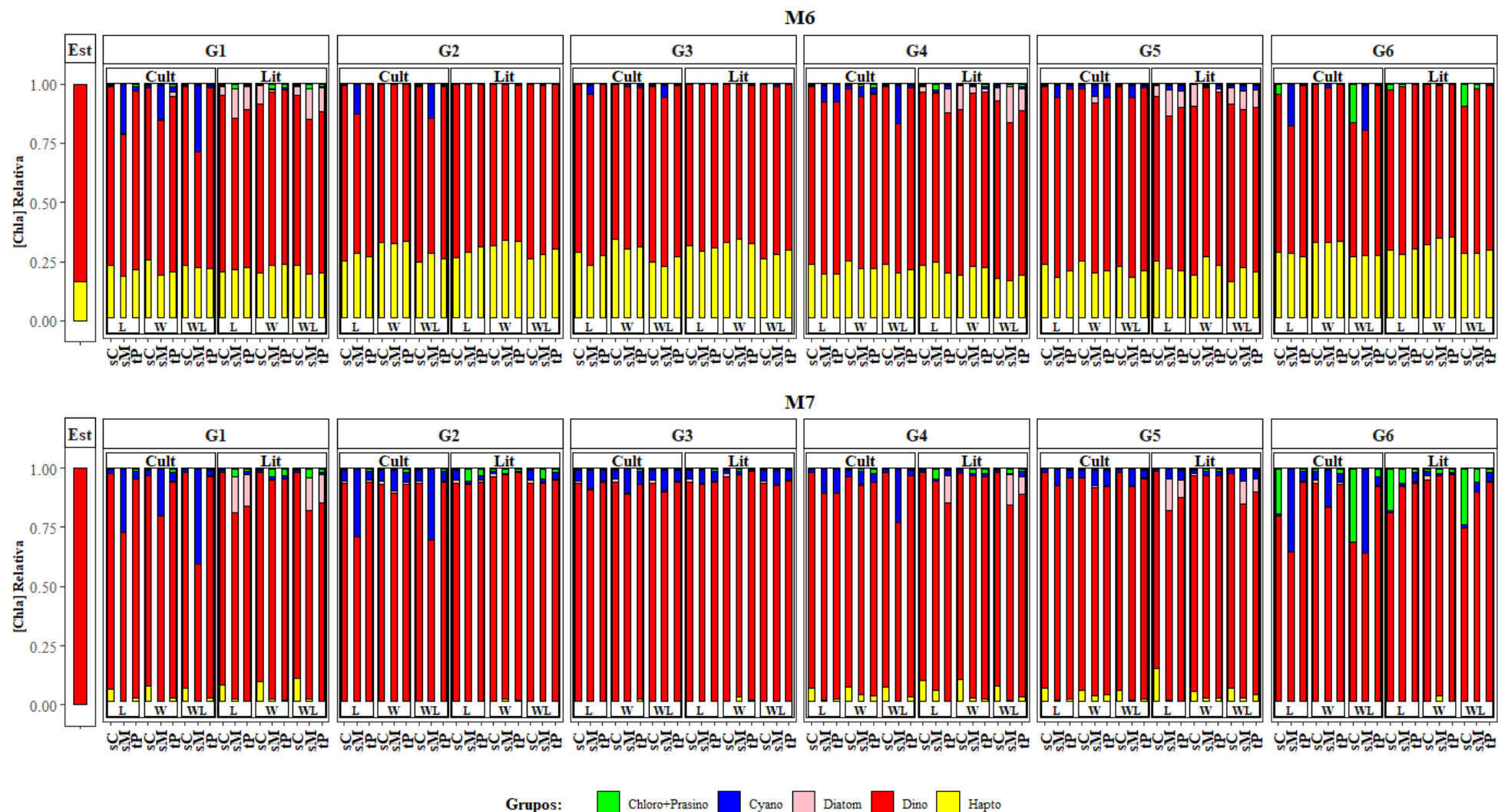


Figura 3.1 Gráficos de barras exemplificativos dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

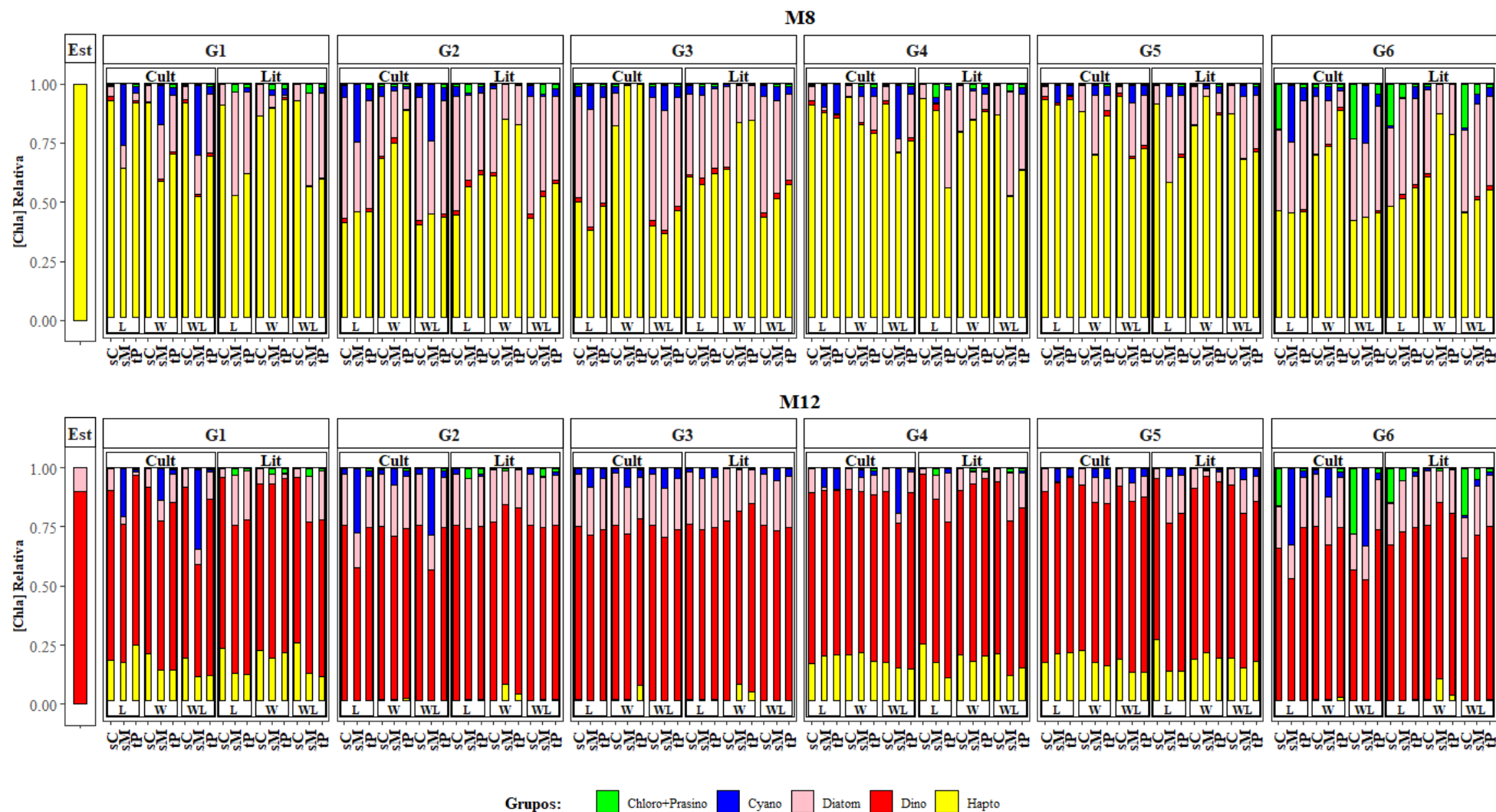


Figura 3.1.Continuação. Gráficos de barras exemplificativos dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.



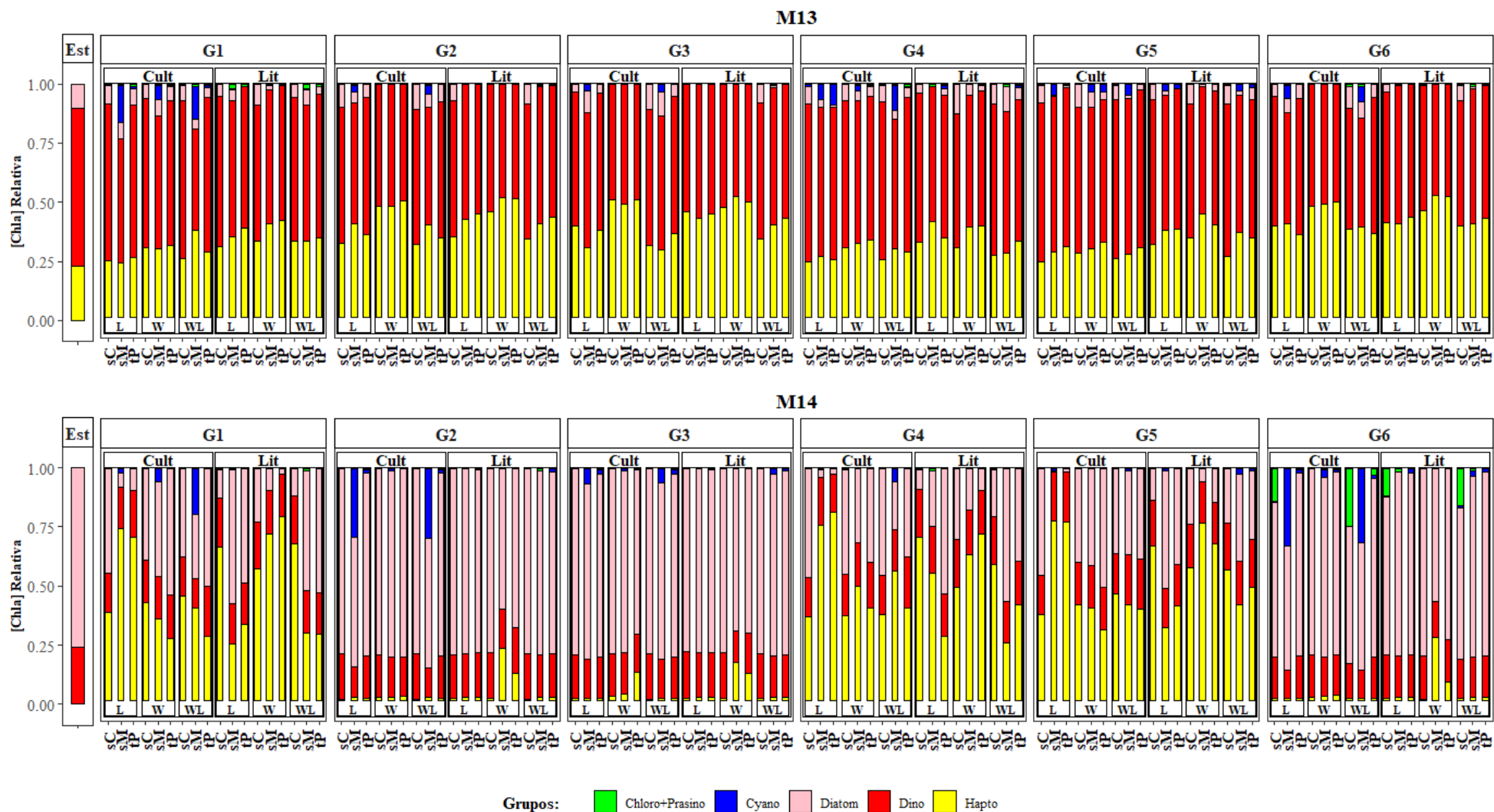


Figura 3.1 Continuação. Gráficos de barras exemplificativos dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.



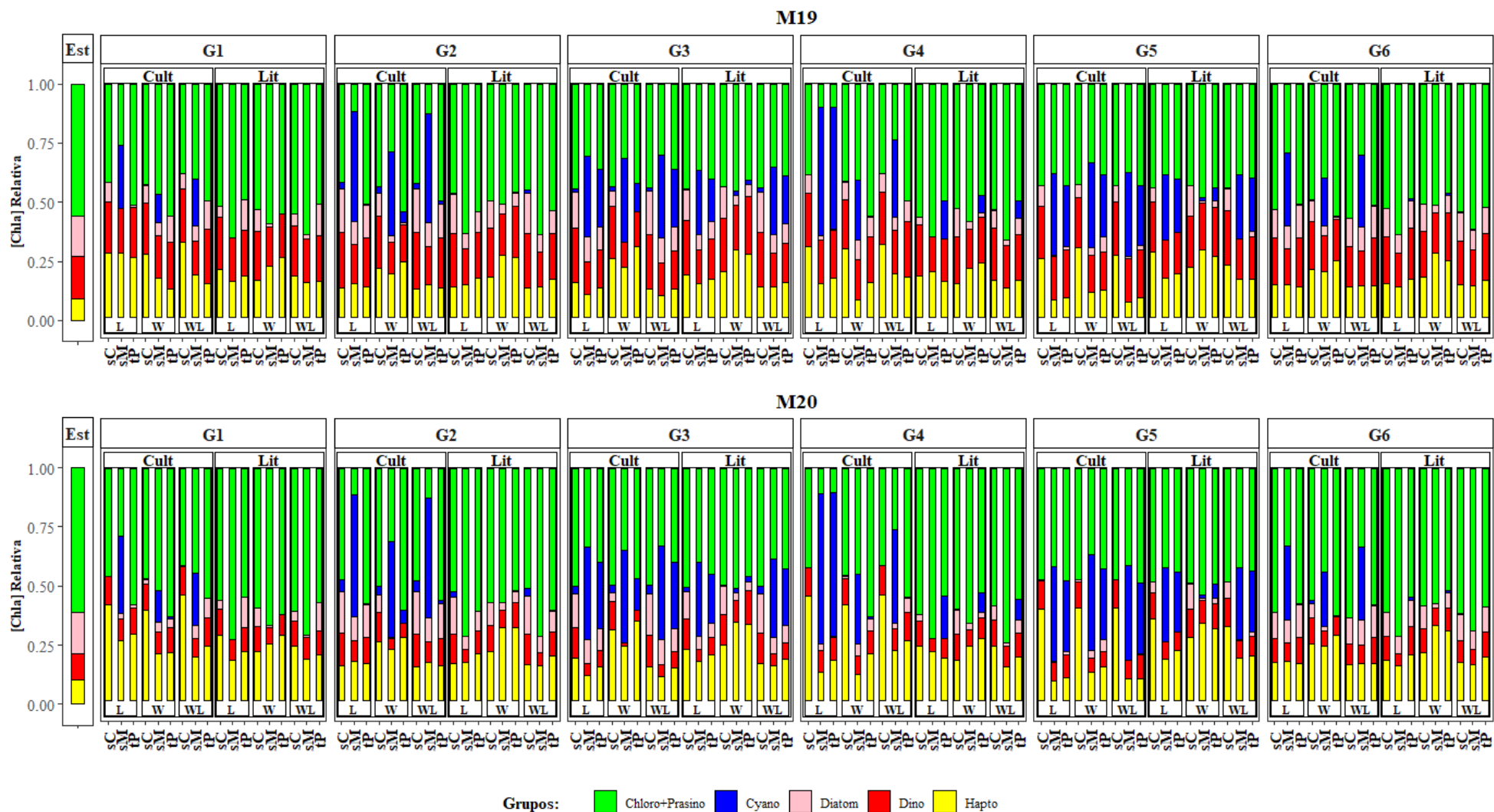


Figura 3.1 Continuação. Gráficos de barras exemplificativos dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

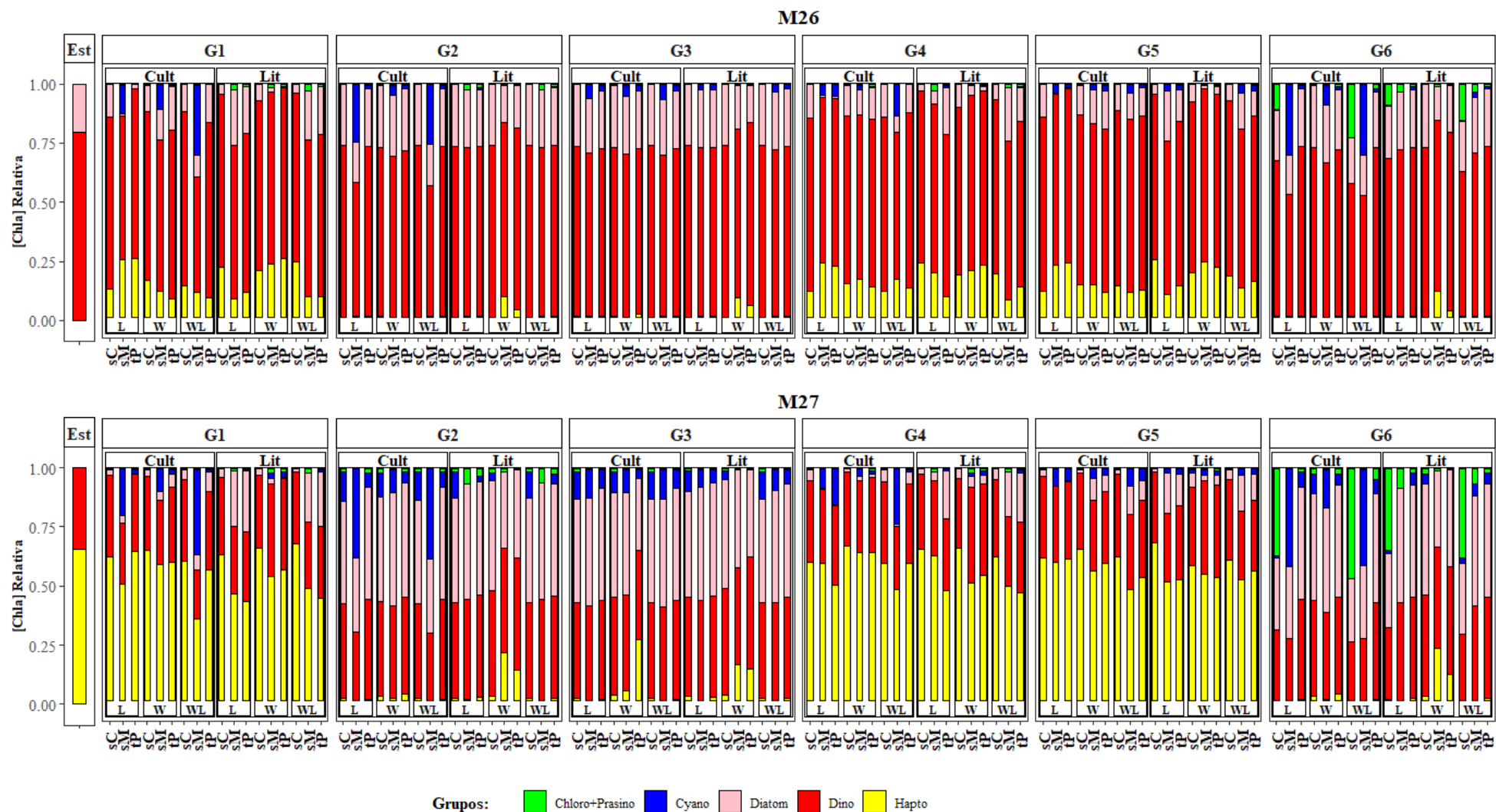


Figura 3.1 Continuação. Gráficos de barras exemplificativos dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

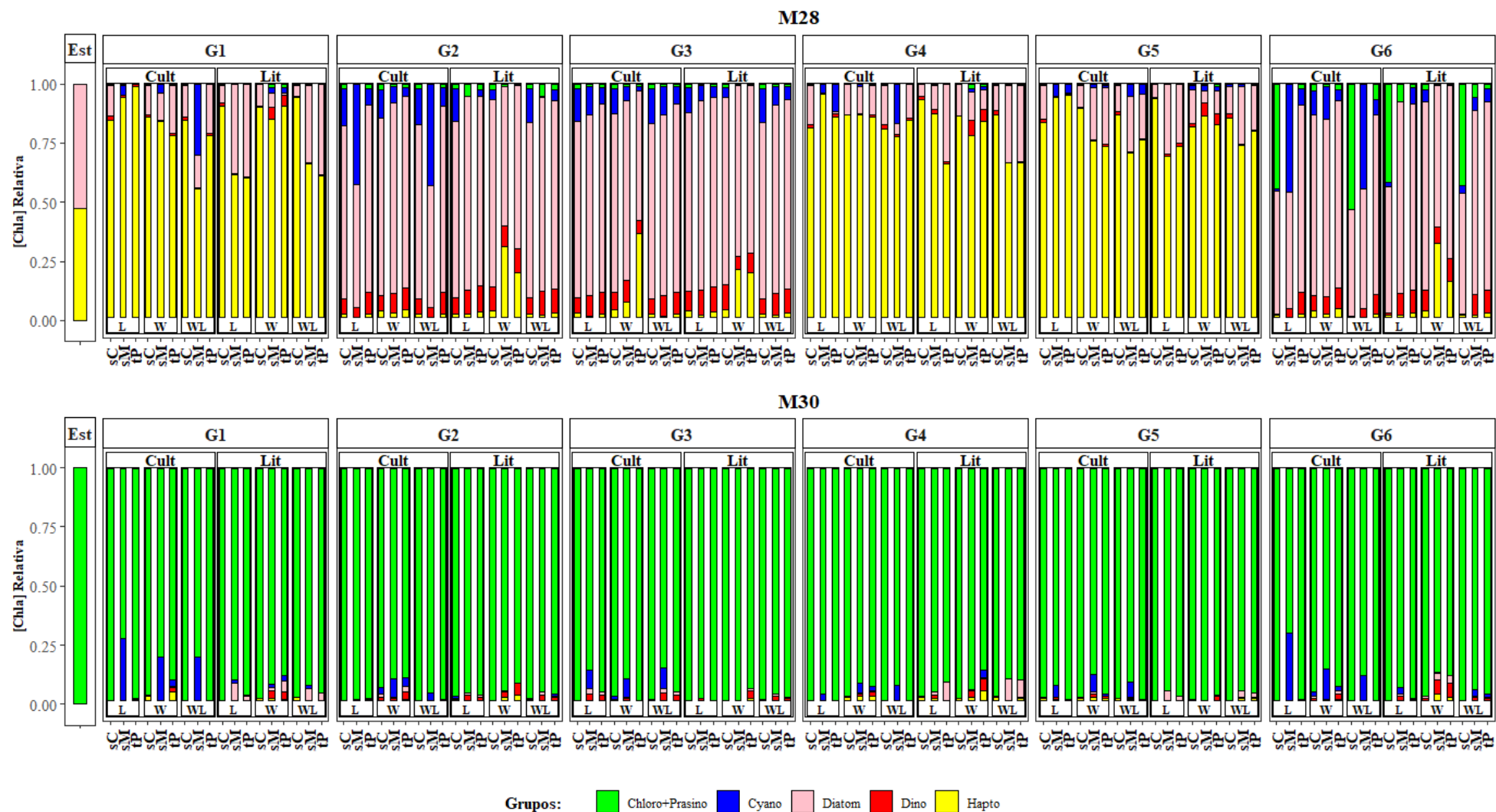


Figura 3.1 Continuação. Gráficos de barras exemplificativos dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

*Tabela 3.1 Sumário dos padrões observados na Figura A1 para cada mistura. Os resultados foram agrupados em 8 Conjuntos consoante o padrão observado. A bold estão assinaladas as misturas representadas na Figura 3.1, como exemplo de cada conjunto. Siglas de acordo com o texto.*

<b>Conjunto</b>	<b>Mistura</b>	<b>Padrão encontrado nos resultados:</b>
1	1	Sobrestimação das Hapto, nos testes com variação de grupos, G1, G4 e G5, e subestimação de Diatom nos restantes testes
	2	
	3	
	5	
	<b>14</b>	
	17	
	<b>26</b>	
2	<b>8</b>	Sobrestimação das Diatom nos testes com variação de grupos, G2, G3 e G6, e subestimação de Hapto nos restantes testes
	21	
	<b>27</b>	
3	<b>15</b>	Testes Lit provocam subestimação de Cyano, e sobrestimação de todos os restantes grupos.
	<b>16</b>	
	23	
4	<b>6</b>	Testes com G1 G4 e G5 Lit sobrestimação de Hapto, Testes com G2 G3 e G6 sobrestimam Diatom e Chlor+Prasino (este último sobretudo em Lit). Sobrestimação de Cyano, essencialmente nos testes Cult.
	<b>7</b>	
	<b>12</b>	
	22	
	25	
5	18	Sobrestimação de Cyano essencialmente nos testes Cult, e sobrestimação geral das Hapto
	<b>19</b>	
	<b>20</b>	
6	<b>13</b>	Em geral há uma sobrestimação de Hapto, e em testes Cult existe o surgimento de Cyano
7	<b>28</b>	G1, G4, G5 sobrestima em geral Hapto, e para testes Cult à sobrestimação das Cyano. G2, G3, G6, sobrestimação de Diatom, substituição de Hapto por Dino e Cyano (no entanto, as Cyano com menor incidência em testes W Lit sM/tP). O teste G6 sC L/WL substitui Hapto por Chloro+Prasino
8	<b>30</b>	Sobretudo, sobrestimação de Cyano, essencialmente nos testes Cult.

### 3.2 Análise das diferenças obtidas em relação ao resultado esperado

Na Figura 3.2 apresentam-se as diferenças por teste, isto é, cada barra representa a soma das diferenças entre os valores estimados de concentração de Chl *a* (valor obtido através da análise de HPLC das monoculturas e o volume colocado em cada mistura, *i.e.*, Est na Figura 3.1) e o resultado obtido por CHEMTAX para cada mistura por teste. O resumo dessas diferenças é também apresentado na Tabela 3.2 e na Tabela A4, em anexo, os resultados das diferenças médias, completo.

Quanto às diferenças médias, observa-se que o *taxon* Hapto sofre sobrestimação em G1, G4, e G5, e subestimação em G2, G3, e G6, o oposto acontece para as Diatom que sofrem sobrestimação em G2, G3, e G6 e subestimação em G1, G4, e G5 (Figura 3.2). De forma geral, as diferenças são mais baixas em G2, G3, e G6 (Tabela 3.2). Os Dino e Chloro+Prasino são em geral subestimados, apresentando valores mais elevados de diferenças médias em G6 com um elevado valor de desvio padrão,  $6.77\% \pm 2.46$  e  $6.25\% \pm 5.65$ , respectivamente. O grupo das Cyano é essencialmente sobrestimado em testes de Cult e subestimado em testes Lit, sendo o que apresenta maiores diferenças entre testes de variação de Rácios, com cerca de 6.97% em Cult. e 3.44% em Lit de diferença média, e entre testes variação de Pigmentos com cerca de 10.3% em sM, 2% em sC e 3.3% em tP (Tabela 3.2).

Note-se também que os *taxa* que apresentam maiores diferenças nos resultados entre testes são as Hapto e Diatom, e que apesar das diferenças entre Cyano e Dino serem semelhantes, cerca de 5%, as Cyano apresentam um desvio padrão muito superior (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 Tabela resumo das diferenças por variação de grupo (G1-G6) calculadas a partir do valor de Chl *a* relativo, utilizando valores absolutos. Nesta tabela apresenta-se o valor médio ( $\bar{X}$ ) e o desvio padrão ( $\sigma$ ) das diferenças por *taxon*.

		Hapto	Cyano	Dino	Diatom	Chloro+Prasino	Total Geral
G1	$\bar{X}$	20.09%	4.60%	5.50%	18.29%	2.84%	10.27%
	$\sigma$	3.91%	6.53%	2.72%	3.45%	1.91%	2.55%
G2	$\bar{X}$	12.54%	6.58%	5.73%	10.31%	3.86%	7.80%
	$\sigma$	1.36%	8.04%	1.63%	0.69%	2.78%	2.49%
G3	$\bar{X}$	12.31%	5.13%	5.35%	10.06%	3.15%	7.20%
	$\sigma$	1.60%	2.69%	0.57%	1.09%	1.12%	0.91%
G4	$\bar{X}$	20.56%	4.85%	4.64%	18.83%	3.72%	10.52%
	$\sigma$	3.08%	5.25%	1.11%	3.14%	2.87%	2.42%
G5	$\bar{X}$	20.75%	4.04%	4.51%	19.02%	2.79%	10.22%
	$\sigma$	3.69%	2.59%	1.16%	3.21%	0.69%	1.42%
G6	$\bar{X}$	12.75%	6.03%	6.77%	10.20%	6.25%	8.40%
	$\sigma$	1.58%	8.14%	2.46%	0.98%	5.65%	2.43%
Total Geral	$\bar{X}$	16.50%	5.20%	5.42%	14.45%	3.77%	9.07%
	$\sigma$	4.81%	5.91%	1.89%	4.89%	3.14%	2.47%

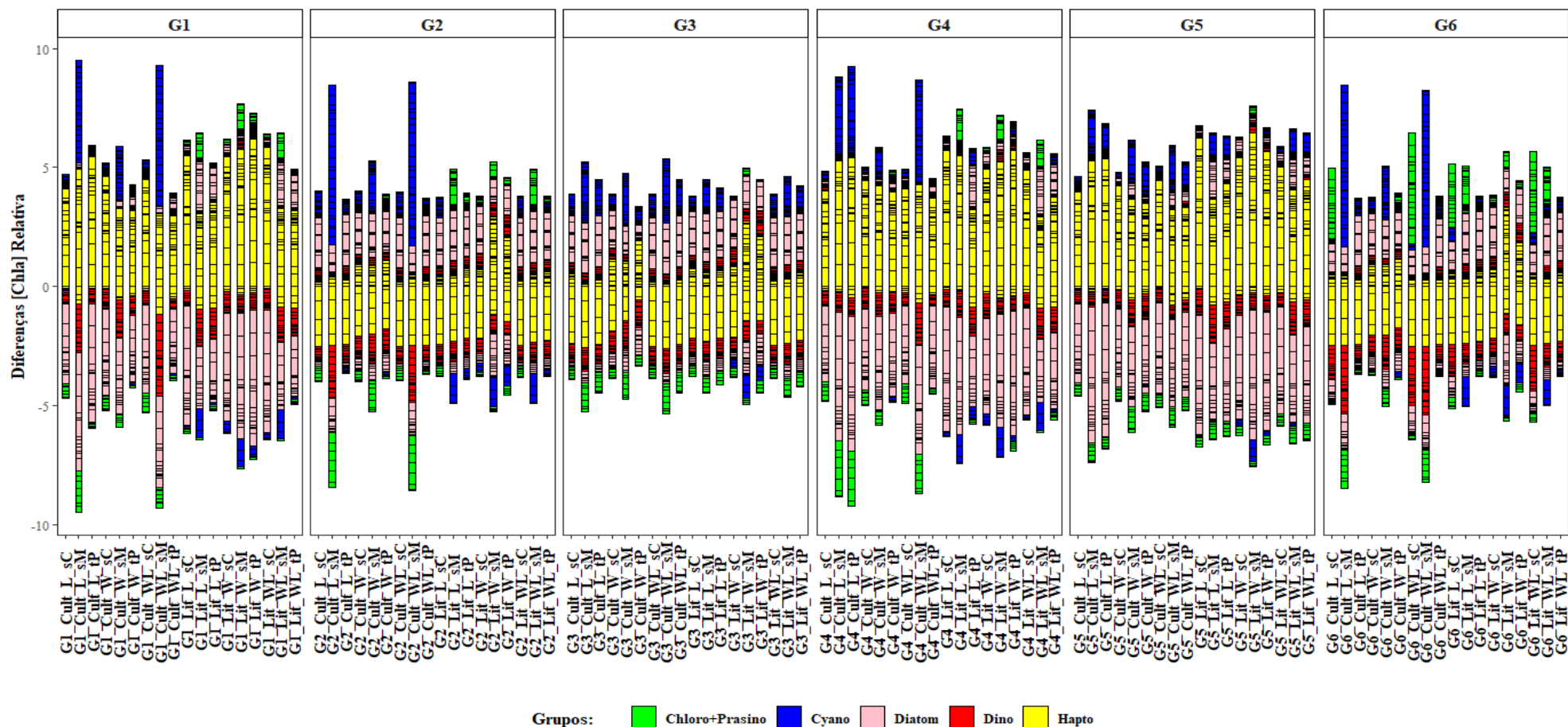


Figura 3.2 Gráfico de barras acumulado das diferenças por teste. Note que as diferenças foram calculadas utilizando a concentração de Chl a relativa obtida por CHEMTAX e o respectivo valor estimado (Est., Figura 3.1). Observe-se que em G1, G4 e G5 as diferenças são em geral superiores. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g. G6\_Cult\_L\_tP refere-se a um teste com abordagem L, onde foram mantidos todos os pigmentos (tP) na matriz de input, e considerados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).



### 3.3 Análise de Correlação de Pearson e Regressões lineares

Na Figura 3.3 apresentam-se os valores de correlação de Pearson para cada *taxon* constituinte das misturas, obtidos entre a concentração absoluta de Chl *a* para cada um dos testes e o valor estimado para cada uma das misturas. Na Tabela 3.3 é sumarizada esta informação, e em anexo estão todos os valores de correlação de Pearson (ver Tabela A7). Observou-se que os valores de correlação para Dino e Chlora+Prasino são próximos de 1, isto é, os resultados obtidos pelos diversos testes tiveram em geral um bom desempenho considerando estes grupos. Por outro lado, as Hapto e Diatom apresentaram resultados muito variáveis, com valores médios de correlação mais baixos, 0.6 e 0.8, respetivamente. Os valores de correlação das Diatom são mais elevados em geral em G2, G3, e G6, isto é, quando as Hapto são consideradas em conjunto. As Cyano, apesar de em geral terem apresentado valores elevados de correlação, para testes com variação de Lit\_sM em G1, G2, G4, G6, os valores de correlação são perto de 0, ou seja, as Cyano apresentam valores de correlação mais elevados quando as Chlora e Prasino são consideradas em conjunto (Chlora+Prasino). As Hapto apresentam valores de correlação mais elevada em G1, G4, e G5. Neste *taxon*, aqueles que apresentam valores de correlação mais elevados são as Hapto 6 e Hapto 3 (ver Tabela A8). Chlora+Prasino apresenta valores de correlação mais elevados juntos, em G5 e G3 e quando em separado em G1 e G6. Quando considerados em separado, Prasino é aquele que apresenta valores de correlação mais baixo (ver Tabela A8).

Adicionalmente, foram analisados, por *taxon*, os gráficos de dispersão entre os valores de Chl *a* obtidos por CHEMTAX e os valores estimados para cada mistura, com a correspondente regressão linear. Foi verificada a existência frequente de falsos positivos, especialmente para concentrações baixas de clorofila, para Hapto em G1, G4 e G5. O mesmo foi também verificado em G2, G3 e G6, para os restantes *taxa*, exceto Dino. Isto é, em G1, G4, e G5 surgem Hapto quando não estão presentes, já em G2, G3, e G6 ocorre sobrestimação dos restantes *taxa* quando em baixas concentrações, ou seja, apresentam mau desempenho a baixas concentrações. Em anexo encontram-se alguns exemplos destas relações (Figura A2).

Ainda para as Hapto, em G2, G3, e G6, grupos com menor valor de diferenças média absolutas, cerca de 12.5%, (na Tabela 3.2), apresentam menor dispersão em valores baixos de concentração, isto é, tem um bom desempenho, no entanto, um valor de correlação reduzido, entre 0.43 e 0.48 (Tabela 3.3). Isto pode ser observado com mais detalhe na Figura A2.

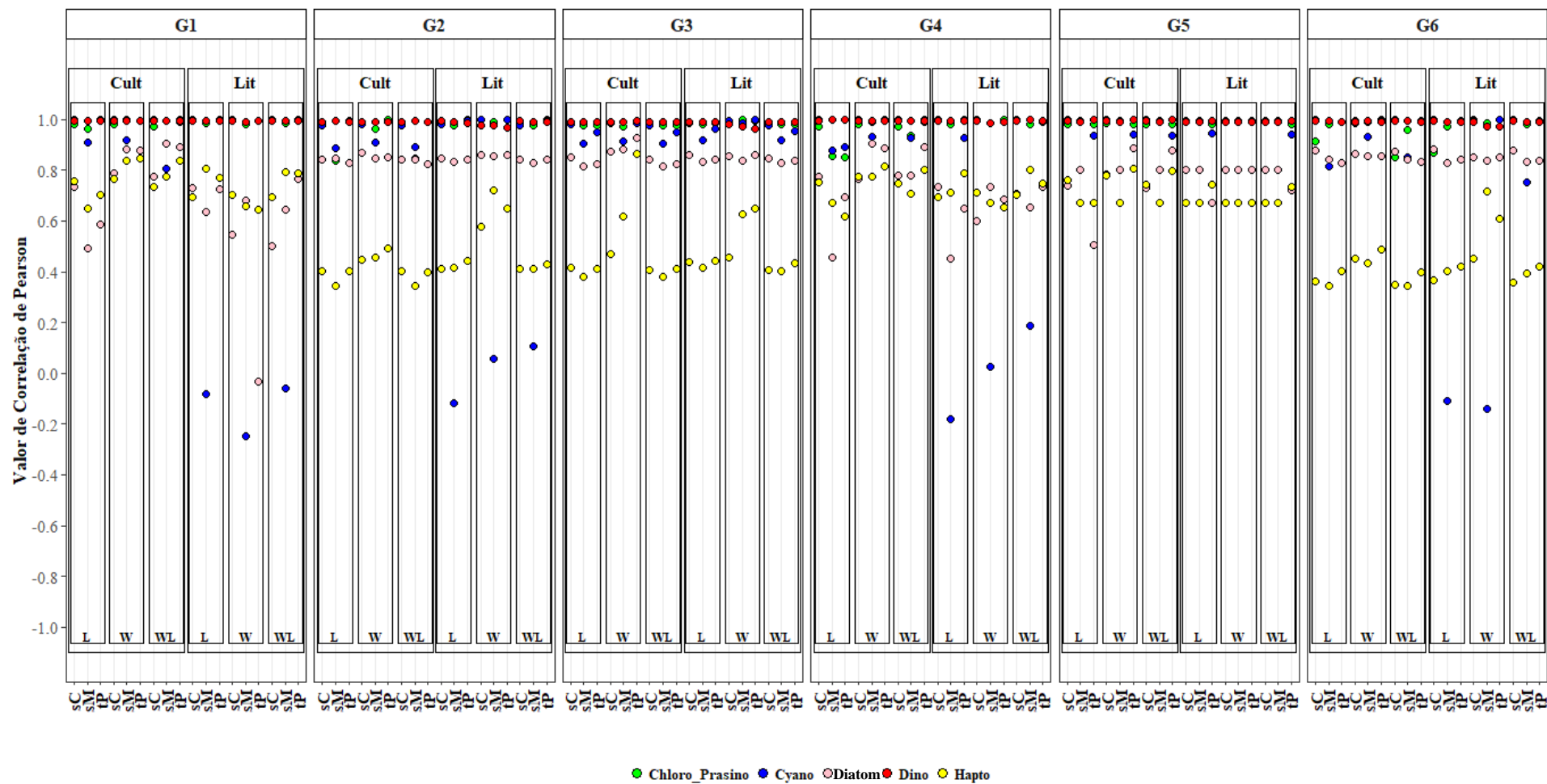


Figura 3.3 Valores de Correlação de Pearson obtidos entre a concentração absoluta de Chl *a* para cada um dos testes e o valor estimado para cada uma das misturas. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP.

Tabela 3.3 Tabela resumo para cada taxon, por variação de Grupo (G1-G6) dos valores de Correlação de Pearson obtidos entre a concentração absoluta de Chl a para cada um dos testes e o valor estimado para cada uma das misturas. Com o mínimo (Mín.), máximo (Máx.), média ( $\bar{X}$ ) e desvio padrão ( $\sigma$ ). Note que Dino apresentam o valor de Correlação médio mais elevado e Hapto o valor de correlação médio mais baixo. Hapto e Diatom alternam os valores de correlação, ou seja, quando uma tem valores mais elevados a outra tem valores mais baixos.

		Hapto	Cyano	Dino	Diatom	Chloro+Prasino
G1	Mín.	0.646	-0.248	0.989	-0.034	0.965
	Máx.	0.844	0.999	0.997	0.903	0.997
	$\bar{X}$	0.747	0.790	0.996	0.674	0.989
	$\sigma$	0.065	0.428	0.002	0.219	0.010
G2	Mín.	0.342	-0.119	0.967	0.826	0.835
	Máx.	0.723	0.997	0.995	0.868	0.998
	$\bar{X}$	0.453	0.810	0.988	0.844	0.970
	$\sigma$	0.100	0.370	0.007	0.011	0.048
G3	Mín.	0.381	0.907	0.963	0.814	0.973
	Máx.	0.865	0.998	0.993	0.928	0.997
	$\bar{X}$	0.480	0.958	0.988	0.847	0.982
	$\sigma$	0.128	0.033	0.008	0.027	0.006
G4	Mín.	0.618	-0.179	0.987	0.451	0.849
	Máx.	0.815	0.999	0.998	0.904	0.998
	$\bar{X}$	0.730	0.809	0.996	0.716	0.970
	$\sigma$	0.056	0.374	0.002	0.126	0.045
G5	Mín.	0.672	0.937	0.991	0.504	0.979
	Máx.	0.808	0.999	0.997	0.886	0.990
	$\bar{X}$	0.709	0.981	0.994	0.774	0.987
	$\sigma$	0.050	0.025	0.003	0.084	0.004
G6	Mín.	0.342	-0.142	0.972	0.827	0.853
	Máx.	0.714	0.999	0.997	0.880	0.998
	$\bar{X}$	0.428	0.835	0.990	0.850	0.963
	$\sigma$	0.096	0.357	0.007	0.018	0.049
Total Geral	Mín.	0.342	-0.248	0.963	-0.034	0.835
	Máx.	0.865	0.999	0.998	0.928	0.998
	$\bar{X}$	0.591	0.864	0.992	0.784	0.977
	$\sigma$	0.163	0.315	0.006	0.128	0.035

### 3.4 Similaridade de Bray-Curtis

A Similaridade de Bray-Curtis (Sim B-C) foi calculada para cada resultado da análise HPLC-CHEMTAX, considerando a composição da comunidade fitoplanctónica em relação à composição teórica/estimada. Devido ao elevado número de resultados, nomeadamente 108 por mistura, optou-se por apresentar apenas os resultados com valores médios de Sim B-C superior a 80%, Tabela 3.4. Os restantes resultados são apresentados na Tabela A5 e Tabela A6, em anexo. O teste com melhores resultados gerais, isto é, com melhor média e menor desvio padrão é G3\_Cult\_W\_tP e o pior é G4\_Cult\_L\_tP (em anexo, na Tabela A6) com valores médios de cerca de  $86.1 \pm 10.2\%$  e  $61.8 \pm 31.4\%$  respetivamente.

Tabela 3.4 Média ( $\bar{X}$ ), máximo (máx.), mínimo (mín.), e desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de Similaridade de Bray-Curtis entre misturas para cada teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP), considerados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que obtêm melhores resultados são G2, G3, e G6. A tabela está organizada por ordem decrescente do valor médio seguido da ordem crescente do valor de desvio padrão.

Teste	Abordagem	Pigmento	Grupo	Rácio	$\bar{X}$	$\sigma$	máx.	mín.
G3_Cult_W_tP	W	tP	G3	Cult	86.098	10.182	97.487	60.640
G2_Lit_L_sC	L	sC	G2	Lit	83.876	21.585	97.164	18.103
G3_Lit_L_sC	L	sC	G3	Lit	83.786	19.160	97.227	25.442
G2_Cult_WL_tP	WL	tP	G2	Cult	83.783	21.842	96.910	17.086
G6_Cult_L_tP	L	tP	G6	Cult	83.717	21.446	96.869	17.992
G2_Cult_L_tP	L	tP	G2	Cult	83.708	21.427	96.910	18.030
G2_Lit_WL_sC	WL	sC	G2	Lit	83.615	21.719	97.219	17.477
G6_Lit_L_tP	L	tP	G6	Lit	83.560	19.834	96.464	22.513
G6_Cult_WL_tP	WL	tP	G6	Cult	83.530	21.427	96.807	17.876
G3_Cult_W_sC	W	sC	G3	Cult	83.514	17.223	96.900	34.714
G6_Cult_W_sC	W	sC	G6	Cult	83.503	18.150	96.717	29.072
G3_Cult_L_sC	L	sC	G3	Cult	83.461	20.531	97.042	20.458
G3_Lit_WL_sC	WL	sC	G3	Lit	83.427	21.584	97.221	17.630
G2_Cult_W_sC	W	sC	G2	Cult	83.291	18.219	96.723	28.547
G6_Lit_WL_tP	WL	tP	G6	Lit	83.275	19.849	96.571	22.109
G3_Cult_WL_sC	WL	sC	G3	Cult	83.252	22.101	97.295	16.193
G3_Lit_W_sC	W	sC	G3	Lit	83.117	18.304	97.900	28.169
G2_Cult_W_tP	W	tP	G2	Cult	83.098	17.126	96.221	35.961
G2_Lit_WL_tP	WL	tP	G2	Lit	83.013	19.407	97.122	23.240
G6_Lit_W_sC	W	sC	G6	Lit	83.004	18.763	97.047	26.034
G1_Cult_WL_tP	WL	tP	G1	Cult	82.865	13.706	95.995	45.924
G6_Cult_W_tP	W	tP	G6	Cult	82.853	16.890	95.748	36.023
G2_Cult_WL_sC	WL	sC	G2	Cult	82.786	21.923	97.299	16.253
G2_Cult_L_sC	L	sC	G2	Cult	82.739	21.757	97.289	16.638
G2_Lit_L_tP	L	tP	G2	Lit	82.570	18.793	96.738	24.904
G2_Lit_W_sC	W	sC	G2	Lit	82.559	15.630	97.834	36.214
G3_Lit_L_tP	L	tP	G3	Lit	82.371	19.316	96.721	24.679
G1_Cult_W_tP	W	tP	G1	Cult	82.098	15.156	95.509	40.272
G3_Lit_WL_tP	WL	tP	G3	Lit	81.986	19.869	96.878	22.726
G6_Lit_W_tP	W	tP	G6	Lit	81.439	14.274	96.536	41.734
G3_Cult_WL_tP	WL	tP	G3	Cult	81.374	21.212	96.756	17.982
G3_Cult_L_tP	L	tP	G3	Cult	81.327	20.976	96.757	18.694
G3_Lit_L_sM	L	sM	G3	Lit	81.238	20.370	96.750	22.097
G2_Lit_W_tP	W	tP	G2	Lit	81.010	13.661	96.495	45.474
G5_Cult_L_sC	L	sC	G5	Cult	80.900	19.564	97.457	16.507
G3_Cult_W_sM	W	sM	G3	Cult	80.853	17.648	96.603	37.511
G3_Lit_WL_sM	WL	sM	G3	Lit	80.828	20.978	96.217	19.666
G3_Lit_W_tP	W	tP	G3	Lit	80.682	13.178	95.509	45.628
G1_Cult_L_sC	L	sC	G1	Cult	80.460	19.681	97.841	16.398
G4_Cult_WL_tP	WL	tP	G4	Cult	80.458	17.678	96.540	33.929
G6_Cult_W_sM	W	sM	G6	Cult	80.407	17.933	94.439	28.910
G1_Lit_WL_tP	WL	tP	G1	Lit	80.112	17.455	94.653	22.974
G4_Cult_L_sC	L	sC	G4	Cult	80.004	18.853	97.514	19.230

Tendo por base os resultados de Sim B-C, foi ainda possível fazer uma matriz de correlações de Pearson, para as várias misturas (Figura A3). Esta permitiu avaliar quais os grupos de misturas com resultados semelhantes, principalmente em termos de correlações mais elevadas (1 ou -1), o que parece indicar um desempenho semelhante. Esta análise permitiu corroborar o agrupamento apresentado na Tabela 3.1.

Na Figura 3.4 estão representados os valores de Similaridade, por mistura, com a respetiva composição em Chl *a*, por *taxon*. Aqui podemos ver que as misturas que têm uma maior dispersão de resultados são as misturas: i) M1, M2 e M3, compostas apenas por Diatom; ii) M8 e M21, compostas por Hapto; iii) M14 composta por Diatom e Dino numa proporção de 3:1; e iv) M27 composta por Hapto e Dino numa proporção de cerca de 2.5:1. Em suma, misturas para as quais a maior parte da Chl *a* provém de Hapto e Diatom, têm elevada variedade de resultados e baixos valores médios de Similaridade em relação ao valor estimado. Exceto a M28, composta por Diatom e Hapto numa proporção de 1:1, que apesar da baixa variabilidade, desvio padrão de cerca de 9%, apresenta uma média baixa, cerca de 62%, isto é, em geral os testes para esta mistura tiveram mau desempenho.

Na Figura 3.5 estão representados os valores de Similaridade de Bray-Curtis por teste, e onde se pode visualizar mais uma vez a elevada variabilidade de resultados que cada teste apresenta dependendo da mistura. As diferenças encontradas para os testes são superiores quando se separam os resultados por grupos (Figura 3.6).

#### 3.4.1. Variação de Grupo

Quanto aos *taxa* a introduzir na matriz de input, os valores mais elevados de similaridade encontram-se em testes com variação G2 e G3, com valores médios de Similaridade de 80% e 82% respetivamente. Sendo que G3 foi identificado como o teste com melhor resultado (Tabela 3.4). Por outro lado, os testes com valores médios de similaridade são G4 e G5, com cerca de 74%. Sendo que G4 foi identificado como pior teste na Tabela 3.4., apresenta valores baixos de Similaridade e elevada dispersão Figura 3.8.

#### 3.4.2. Variação de pigmentos

Relativamente aos pigmentos, observa-se que sM apresenta, em geral, valores de Similaridade de Bray-Curtis mais baixa, cerca de 73%, (Figura 3.6). sC e tP, com cerca de 79% apresentam um valor médio semelhante, no entanto, sC apresenta um maior desvio padrão, cerca de 22%. Por outro lado, tP atinge valores mais baixos de Similaridade dependendo da mistura. Estes resultados são corroborados pela Figura 3.8 e Figura 3.5.

#### 3.4.3. Variação na origem dos rácios

Quanto à origem dos rácios pode observar-se na Figura 3.6 que a diferença nos resultados das médias dos valores de Similaridade de Bray-Curtis é bastante similar, 77% (Figura 3.5). No entanto, o desvio padrão dos testes Lit é ligeiramente superior, cerca de 22%, com valores mínimos de 0.

#### 3.4.4. Variação de abordagem

Pode observar-se através das médias dos valores de Similaridade de Bray-Curtis que as diferentes abordagens apresentam valores semelhantes (Figura 3.6), tendo em geral valores ligeiramente mais elevados com W, 78% Similaridade, indicando melhores testes. Os resultados obtidos na abordagem WL são similares aos obtidos em L (Figura 3.5). Estes resultados são também evidenciados na Figura 3.7, onde se consideram os resultados por variação da origem dos rácios. Neste caso, para Cult, W apresenta uma média de cerca de 80% de Similaridade e L e WL uma média de 75% e 76.5% de Similaridade, respetivamente. Para Lit, L e WL apresentam um valor médio de similaridade de 78% e W 76%.

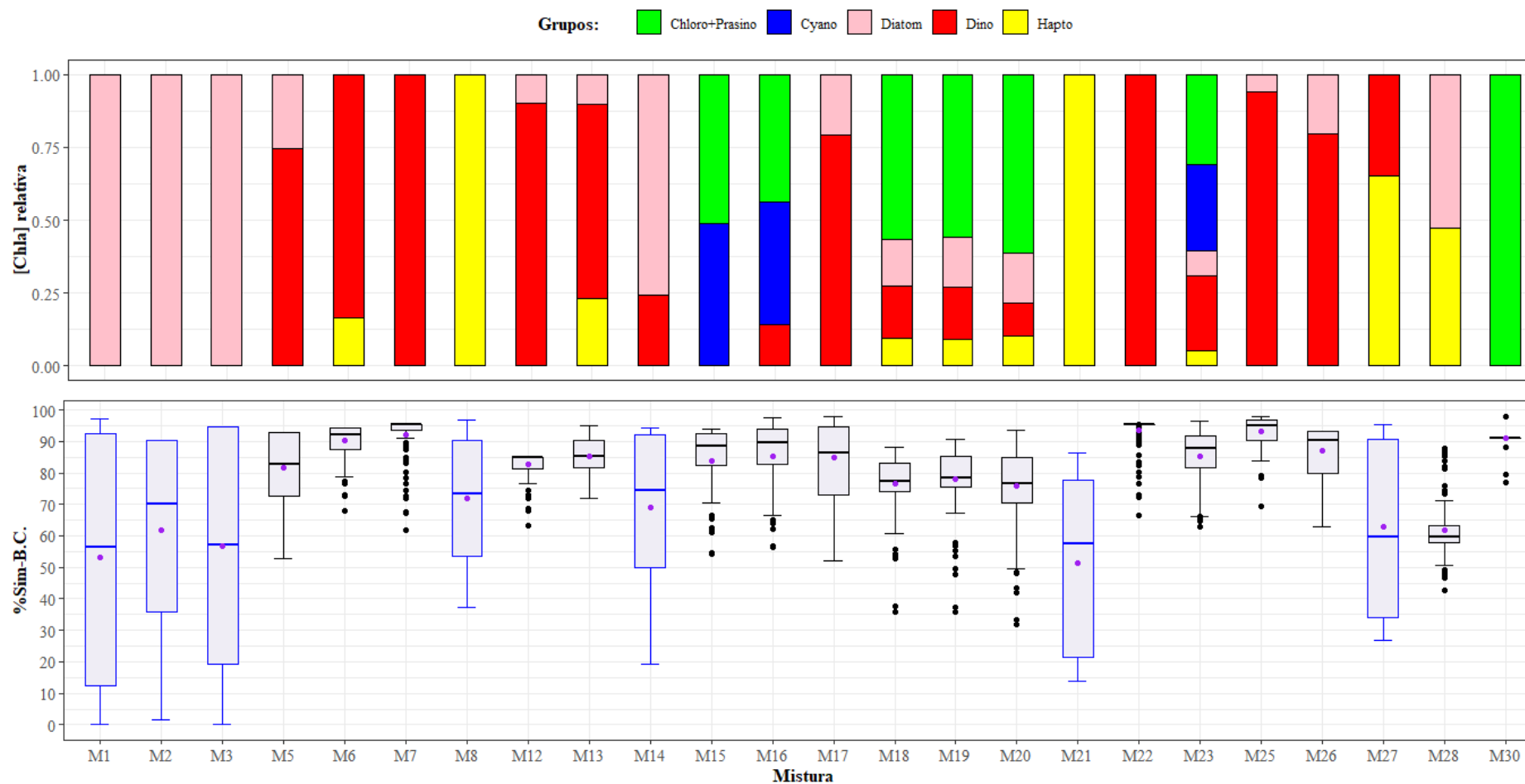


Figura 3.4 Em cima, gráfico de barras acumuladas com composição relativa de concentração de Chl a por mistura. Em baixo, representação de caixa de bigodes com máximo, mínimo, quartis, média (ponto roxo), mediana (barra central) e valores discrepantes (pontos pretos) para os valores de Similaridade de Bray Curtis entre os testes e o valor de Chl a estimado para cada mistura. As caixas azuis representam as misturas com maior variação de resultados para os 108 testes. Note-se que a mistura M30 é a única que contém o grupo Prasino.

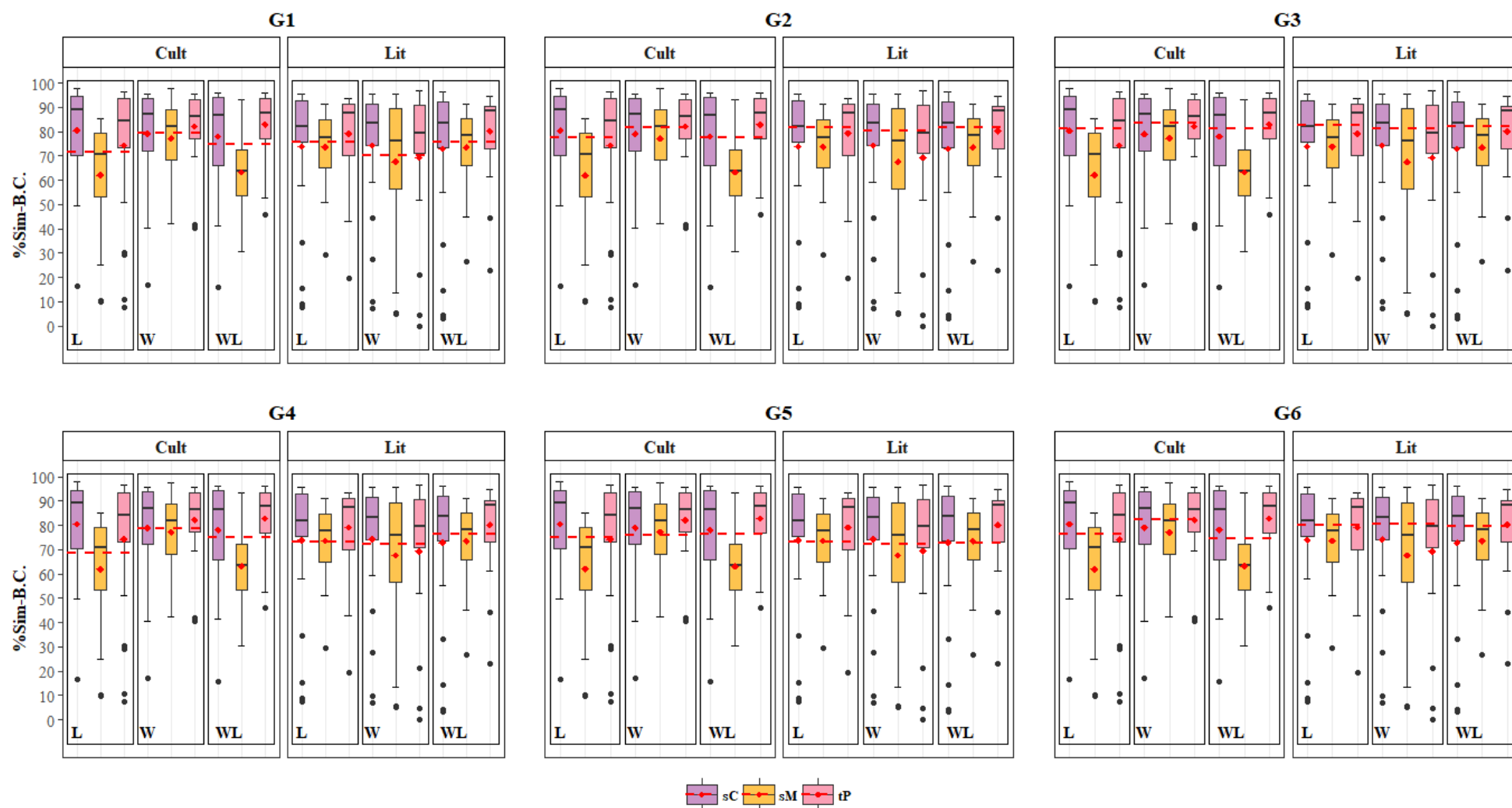


Figura 3.5 Caixa de Bigodes para dados de Similaridade de Bray-Curtis por Teste, sendo que cada ponto representa uma Mistura. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit.

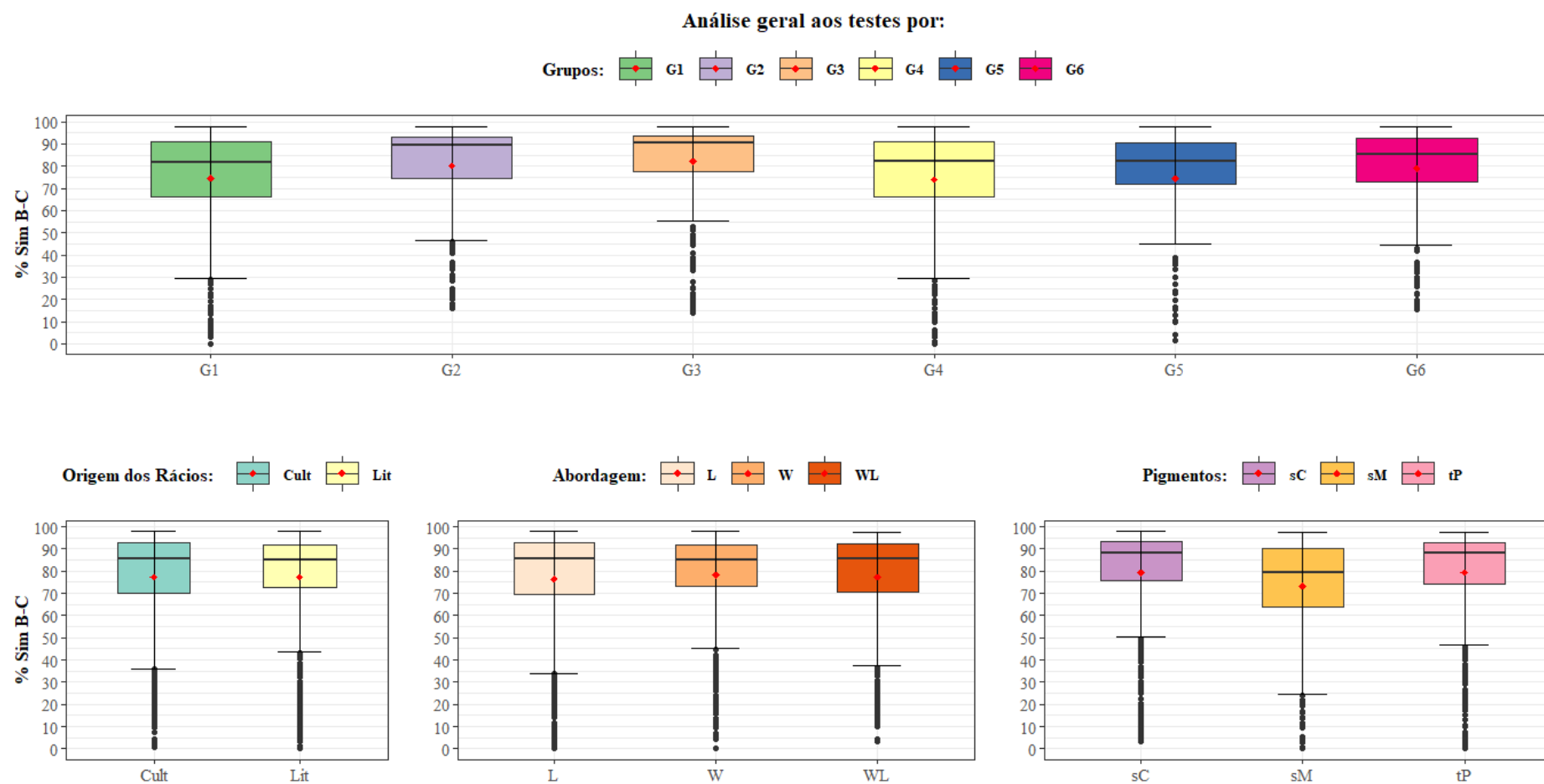


Figura 3.6 Análise Geral através de gráficos de Caixas de bigodes representados por mínimo, máximo, quartis, mediana, média e valores discrepantes dos valores de Similaridade de Bray Curtis obtidos por teste. Na primeira linha apresentam-se os testes agrupados por Grupo; na segunda linha à esquerda testes agrupados por Origem de Rácios; no centro, testes agrupados por Abordagem, e à direita os testes agrupados por Pigmentos. Observa-se que uma alteração nos grupos provoca uma maior variação nos resultados. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit.



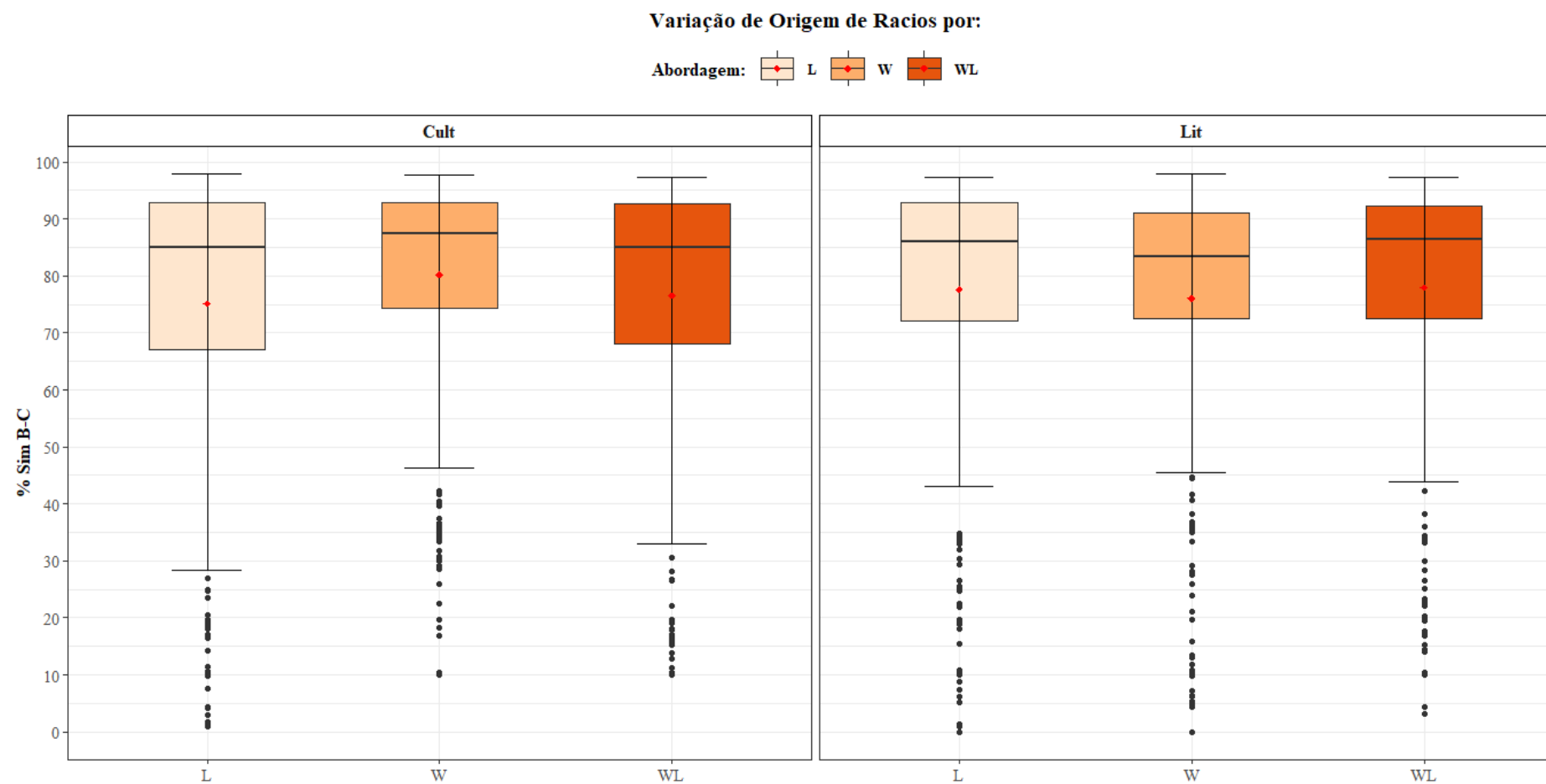


Figura 3.7 Caixa de Bigodes para dados de Similaridade de Bray-Curtis associando a Origem dos Rácios à Abordagem.

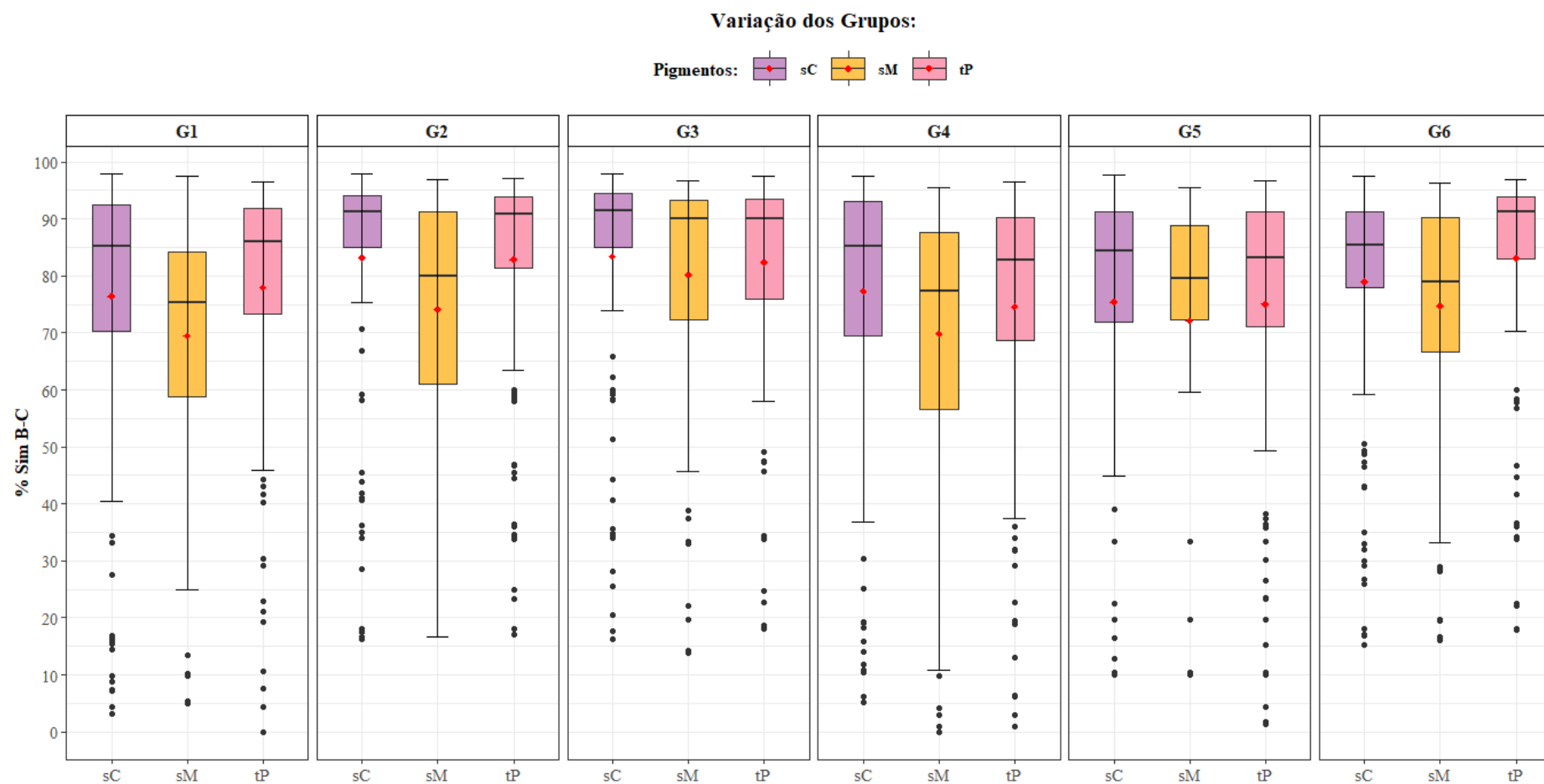


Figura 3.8 Caixa de Bigodes para dados de Similaridade de Bray-Curtis associando os grupos aos Pigmentos utilizados.

### 3.5 Análise de Ordenação Multivariada

Foi ainda realizada uma análise de ordenação multivariada, nomeadamente uma análise de componentes principais (PCA) para avaliar os padrões de variação encontrados. Na Figura 3.9 é possível verificar a separação dos resultados em dois conjuntos diferentes: i) constituído pelos grupos G1, G4, e G5, que parecem sobrestimar as Hapto, apresentando piores resultados para as misturas M1, M2, M3 e M14, com as quais estão negativamente correlacionados, ao contrário do que acontece com as misturas M8, M21, M27; e ii) constituído pelos grupos G2, G3, e G6, onde parece haver uma sobrestimação de Diatom, apresentando piores resultados para M8, M21, M27, com as quais estão negativamente correlacionadas. Estes grupos explicam a dispersão elevada encontrada nas misturas M1, M2, M3, M8, M14, M21, e M27 (Figura 3.4) pois são misturas compostas essencialmente por Chl *a* proveniente de Diatom e Hapto, para as quais os testes têm menor desempenho (Figura 3.3)

A análise de componentes principais (PCA; Figura 3.10) permitiu ainda identificar que para o conjunto ii) existe uma maior semelhança entre testes (menor dispersão). Nota-se também que são maioritariamente as amostras sM (quadrados) se localizam na parte superior do PCA, com médias de similaridade mais reduzidas (representada pelo tamanho dos pontos), indicando maiores diferenças dos restantes testes (parte inferior do PCA).

A organização efetuada pelo PCA evidencia a importância da variação dos grupos nos resultados do CHEMTAX.

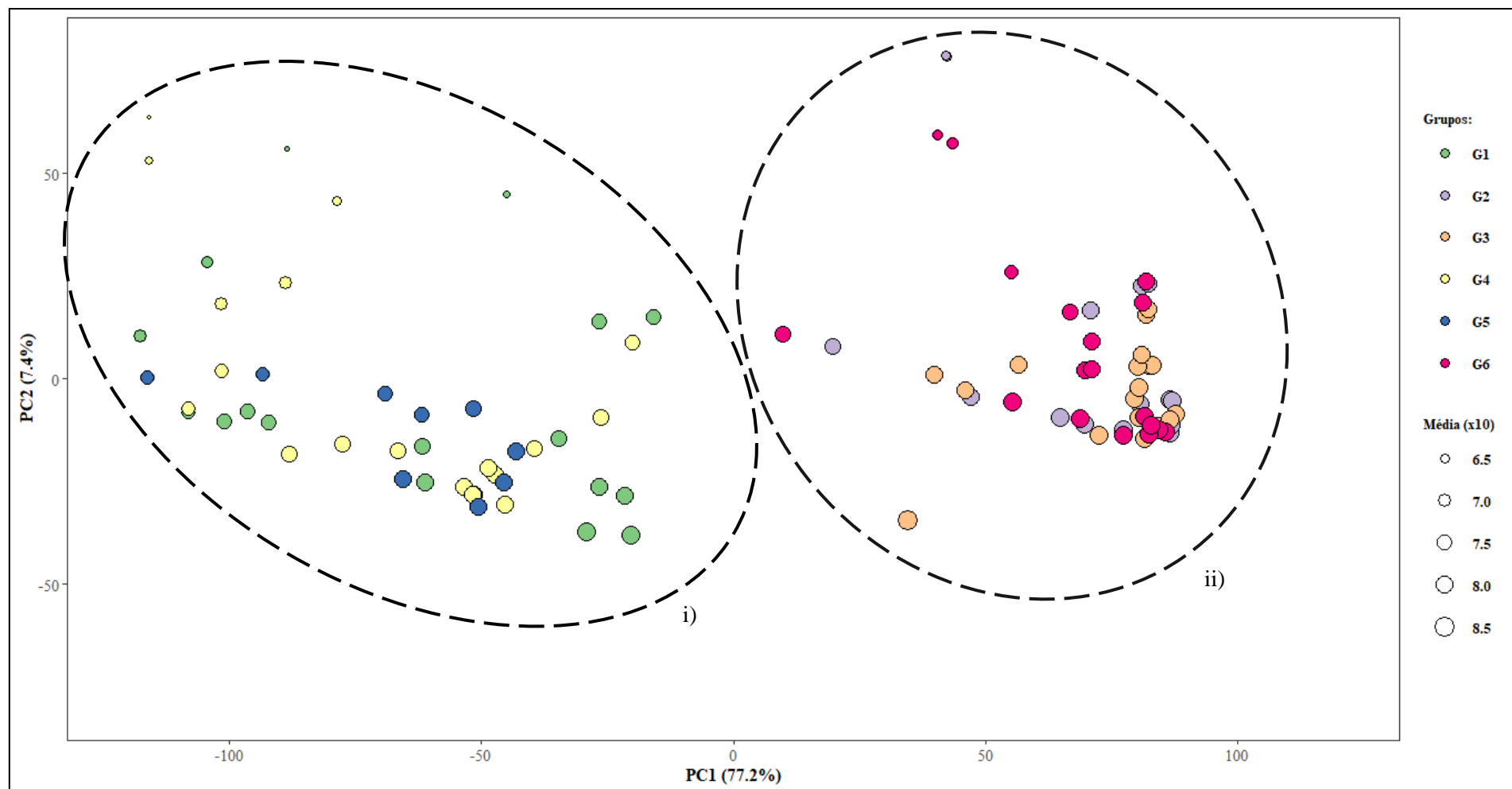


Figura 3.9 Análise de Componentes Principais (PCA). Dois conjuntos formados: i) com G2, G3, e G6 associados às misturas M1, M2, M3, e M14, correlacionadas positivamente com PC1; e ii) com G1, G4, e G5 associados às misturas M8, M21 e M27, correlacionadas negativamente com o PC1.

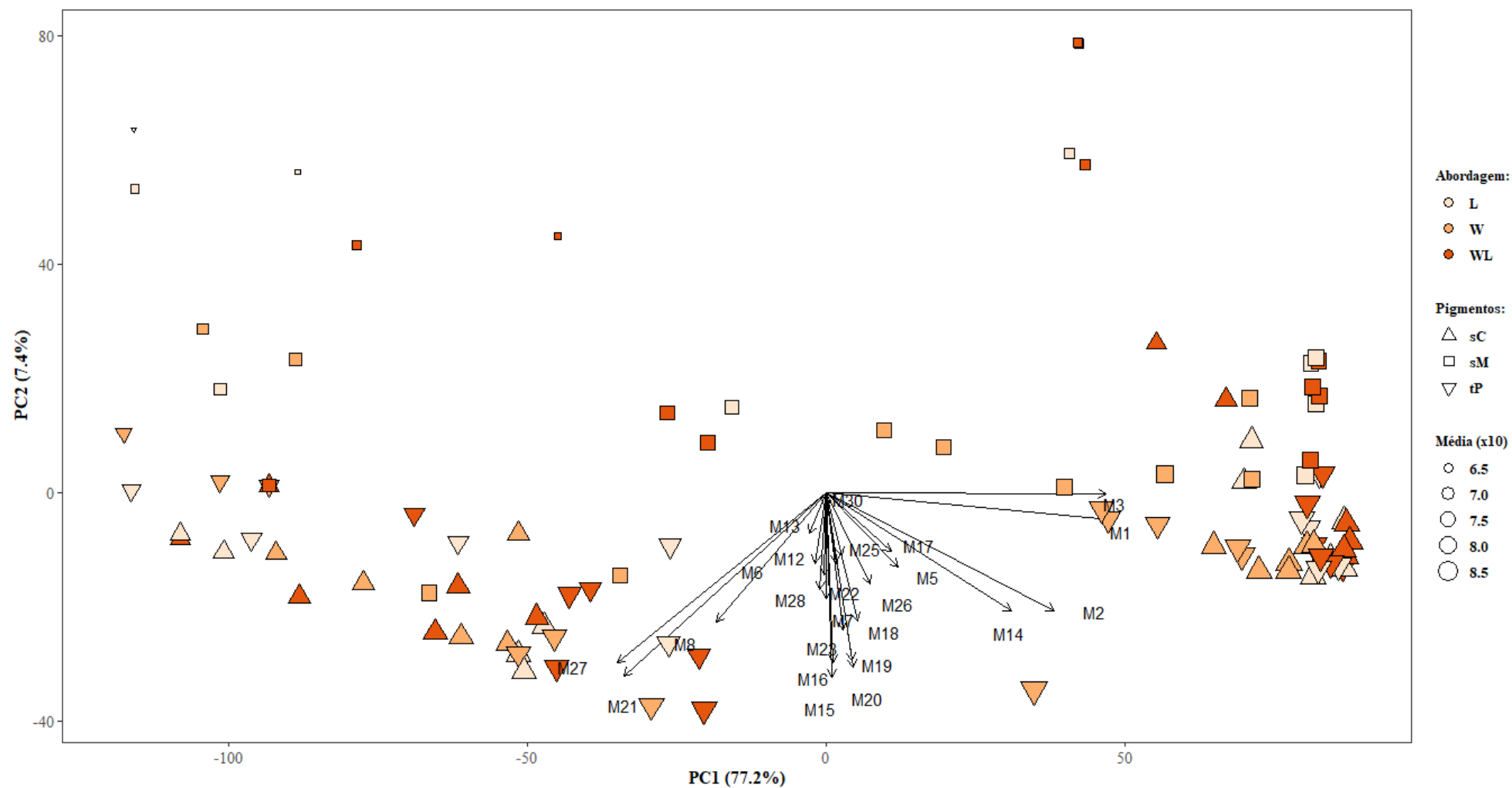


Figura 3.10 Análise de Componentes Principais (PCA). Dois conjuntos formados: i) com G2, G3, e G6 associados às misturas M1, M2, M3, e M14, correlacionadas com PC1 positivamente; e ii) com G1, G4, e G5 associados às misturas M8, M21 e M27, correlacionadas negativamente com o PC1.

# Capítulo 4

**Discussão**

Este estudo teve como objetivo investigar de que forma alterações nos parâmetros da matriz de *input* e na abordagem de análise utilizada pelo programa CHEMTAX afetam os resultados em termos da composição das comunidades fitoplânctônicas em estudo. Apesar dos autores que desenvolveram esta metodologia referirem a necessidade em utilizar amostras conhecidas (e.g. culturas) e/ou amostras artificiais (*i.e.* manipulando os valores de pigmentos obtidos através de um componente aleatório, para adicionar variabilidade e, dessa forma, quantificar o erro), para avaliar e otimizar o desempenho do CHEMTAX, de facto, na literatura, são poucos os trabalhos que reportam este tipo de avaliação. E, dos poucos estudos com dados artificiais existentes, a maioria utiliza como ponto de partida amostras naturais, *i.e.* sem um conhecimento prévio sobre a composição do fitoplâncton nas amostras, apenas variando as matrizes de *input* (de dados ou rácios) (Irigoien et al. 2004, Latasa 2007, Armbrecht et al. 2015). Os restantes estudos de otimização são essencialmente relativos à quantificação de mudanças nos rácios devido a alterações de luz e/ou nutrientes (Schlüter et al. 2000, Ruivo et al. 2011) ou de comparação de dados de microscopia com as análises HPLC-CHEMTAX (Higgins et al. 2011, Kozlowski et al. 2011), no entanto, também estes restritos a amostras naturais. Neste estudo, o uso de culturas permitiu a comparação direta dos resultados pois a composição de cada amostra era conhecida, representando assim a primeira contribuição com uma avaliação integrada de desempenho do CHEMTAX, com vista a fornecer recomendações para a otimização do seu uso.

Alguns autores referem que o CHEMTAX nunca deve ser utilizado sem um conhecimento prévio das amostras (Irigoien et al. 2004), ou seja, as matrizes de *input* têm de ser ajustadas à área de estudo, considerando as espécies/grupos existentes e as condições ambientais; e que uma calibração incorreta será a principal fonte de erro na determinação taxonómica baseada nos pigmentos (Irigoien et al. 2004). De uma forma geral, este estudo mostrou que o CHEMTAX, apesar de alguma variabilidade nos resultados, é genericamente robusto. Os piores resultados apresentaram valores médios de similaridade superiores a 60%, e os melhores apresentaram valores perto dos 90%.

De facto, para algumas misturas, os resultados foram bastante consistentes para quase todos os 108 testes, apresentando apenas diferenças ligeiras em termos de composição relativa dos grupos, sendo que cerca de 70.8% das misturas apresentaram valores de Similaridade de Bray Curtis com baixa variação/dispersão. No entanto, para outras misturas, os resultados revelaram uma grande diferença considerando as composições relativas obtidas para os diferentes testes (29.2% das misturas). De referir, no entanto, que a (in)consistência observada não está associada necessariamente a (maus)bons resultados, isto é, existiram misturas que independentemente dos testes apresentaram consistentemente maus resultados (*e.g.* M28), e misturas para os quais os testes foram inconsistentes, mas dentro destes ocorreram bons resultados (*e.g.* M1). Os resultados na similaridade para as misturas variaram entre 51% e 94%.

#### 4.1 Variação de Grupos

Os grupos de fitoplâncton podem ser determinados por métodos de microscopia ou através da identificação de pigmentos diagnosticantes. No entanto, estes nem sempre estão presentes, quer seja pelas características do método de análise, ou por variações naturais no perfil pigmentar dos grupos.

Tendo em conta as possíveis variações pigmentares dentro de um mesmo grupo, Schlüter et al. (2000) utilizou a média de duas espécies, de um mesmo grupo, como aproximação ao rácio mais apropriado à construção da matriz de *input* do CHEMTAX. Como este trabalho obteve erros elevados, foi então recomendada a utilização dos rácios da espécie dominante. No entanto, esta tendência não foi verificada neste trabalho. Por exemplo, no caso das Chloro+Prasino, os melhores resultados foram obtidos quando as diferentes classes estavam juntas, *i.e.* nos grupos G3 e G5, quando se utilizou um rácio médio para as três espécies presentes. A mistura M30 (composta apenas por Chloro+Prasino), é

disso exemplo: considerando todas as variações, apresenta em geral bons resultados, no entanto, quando se analisa a variação de grupo, G1 e G6, apresentaram resultados piores. Nestas variações, as espécies de Chloro e Prasino foram consideradas em separado (espécie 6, 13, 28 e 34), apresentando-se como rácio para a matriz de *input* os valores correspondente de cada espécie

Considerando os grupos minoritários, neste estudo, ao contrário do reportado por Mackey et al. (1996) e Latasa (2007), não se verificaram problemas nos resultados obtidos quando estes estavam presentes nas amostras. O uso de uma abordagem com corridas sucessivas, nomeadamente L e WL, pode ter resolvido esta questão. As Cyano representaram, neste trabalho, um grupo minoritário nas amostras, contribuindo com apenas 5.03% do total de Chl *a* e, segundo os autores citados, estas deveriam ser um grupo problemático. No entanto, obtiveram-se valores elevados de correlação das concentrações de Chl *a* obtidas por CHEMTAX e a concentração de Chl *a* teórica, i.e., a estimada, pois apesar de ser um grupo minoritário apresenta rácios de pigmentos muito diferentes dos restantes grupos, a não ser quando se removem os pigmentos minoritários (sM) que se aproximam das Chloro1.

Por outro lado, grupos que se podem considerar majoritários, como as Diatom e Hapto, que representaram 24.18% e 16.08% do total de Chl *a* de todas as misturas, respetivamente, foram claramente grupos problemáticos. Em todos os testes com estes grupos presentes obtiveram-se os piores resultados, com cerca de 17% (Diatom) e 15% (Hapto) de diferença média. Neste contexto, e em geral, ocorreu subestimação de Diatom e sobrestimação de Hapto. Este resultado está de acordo com Latasa (2007) que refere que quando ocorre ‘conflito’ entre grupos, este mantém-se independentemente da matriz. O conflito (ou confusão) existente entre o grupo de Hapto e Diatom ocorre devido à sua semelhança pigmentar.

Mackey et al. (1997) afirma que o CHEMTAX não poderá atribuir corretamente a concentração de Chl *a* aos grupos taxonómicos quando são incluídos erroneamente grupos na análise (i.e. quando na matriz de input são introduzidos grupos que não estão presentes nas amostras em análise a Chl *a* não será bem distribuída). Apesar disto não ter sido testado, isto é, todos os grupos incluídos eram constituintes das misturas, ocorreram misturas que na realidade eram constituídas por apenas um dos *taxa*, nomeadamente M1, M2, M3, M8, M7 M21, M22 e M30. Estas misturas permitiram observar que mesmo quando uma amostra é dominada por um só grupo, este poderá ser bem identificado/quantificado. Isto é, em caso de *bloom* de um dado *taxon* durante um período de amostragem, ou num dado local de amostragem, este poderá ser bem identificado desde que sejam bem definidos os restantes parâmetros. No teste identificado como melhor, ou seja, com valor de similaridade mais elevado, todas estas misturas têm valor de similaridade superior a 84. Ainda assim, há que ter em conta que, o CHEMTAX tenta alocar concentração de Chl *a* a todos os grupos introduzidos, acabando, em certas situações, por ocorrerem falsos positivos, isto é o programa aloca concentração de Chl *a* a grupos que não estão, de facto, na amostra. No entanto, em quantidades reduzidas. Maiores problemas poderão ocorrer caso se incluam grupos que possam criar confusão na análise, neste caso Hapto e Diatom, devido à sua semelhança pigmentar.

Tal como indicado por Irigoien et al. (2004), para a escolha dos grupos a inserir na matriz de *input*, o conhecimento *a priori* dos grupos ecológicos presentes nas amostras é essencial na obtenção de bons resultados através da análise de CHEMTAX. Estes autores utilizaram amostras costeiras de superfície colhidas junto a Plymouth (UK), no English Channel, testando o CHEMTAX: i) às cegas, isto é, sem análise *a priori* dos grupos nas amostras, utilizando apenas informação da literatura para a região; e ii) análise direta, isto é, procederam à observação ao microscópio das amostras, introduzindo na matriz os grupos observados e os pigmentos referentes às espécies que dominavam o grupo. Para esta última análise as amostras foram divididas em quatro conjuntos de acordo com a dominância das espécies nas amostras. Os autores obtiveram, através da análise às cegas, uma imagem distorcida do



padrão sazonal de fitoplâncton, devido às elevadas concentrações de fucoxantina. O desconhecimento das amostras ao nível da espécie pode induzir em erro pois ocorrem espécies que divergem do habitual apresentando diferenças significativas nos pigmentos presentes. No presente trabalho verificou-se uma variação de 8% na similaridade média aquando da utilização de diferentes grupos. A similaridade dos resultados com o valor estimado variou entre 74% e 81%, dependendo da escolha de grupos a introduzir na matriz de *input*. A sua distinção deve ser efetuada não pelo *taxa* de menor ou maior ordem, mas sim pela semelhança em rácios, como se pode perceber através da análise dos resultados das Hapto e Chloro+Prasino (e.g. Figura A2, ver anexo).

O *taxon* Chloro+Prasino apresenta elevadas semelhanças quanto à composição pigmentar. Quando analisados os resultados uniformizados, isto é, somando as concentrações de clorofila *a* obtidas por CHEMTAX para cada *taxon* (Chloro1, Chloro 2 e Prasino), os valores médios da correlação com o valor estimado são relativamente semelhantes entre si e superiores a 0.96. Desta forma, fazendo esta uniformização, separar ou não as Chloro+Prasino nos grupos taxonómicos de maior ordem (e.g. Divisão) parece ser indiferente. No entanto, quando se analisam os resultados sem uniformização de grupos (Anexo Tabela A8), verifica-se que a distribuição de Chl *a* apresentou algumas inconsistências quando foi feita a separação entre as Chloro (1+2) e as Prasino2 (em G1, G2, G4 e G6; ver Anexo Tabela A8) comparando com os resultados uniformizados para 5 grupos apenas, (apresentados na Tabela 3.3), os valores de correlação médios obtidos para as Prasino2 variaram entre 0.53 e 0.71. Relativamente às Hapto, que apresentaram diferenças internas mais marcadas quanto à composição pigmentar, estas obtiveram melhores resultados de correlação de Pearson ( $> 0.7$ ) quando este *taxon* foi introduzido no CHEMTAX separadamente, pelo grupo de menor ordem taxonómica (e.g. Classe), como acontece em G1, G4, e G5 (Tabela 3.3). No entanto, quando se analisa internamente o grupo, utilizando os resultados não uniformizados (Anexo Tabela A8), observa-se que as Hapto6, devido à sua diferença pigmentar (único grupo com os pigmentos Chl *c3* e Hex-*kFuco*), obtêm uma elevada correlação em todos os testes, ao contrário do que acontece com as Hapto1 e Hapto3 que apresentam, em geral, piores resultados em todos os testes, principalmente utilizando os rácios da literatura (Lit). Tal facto reforça a necessidade em conhecer a composição da comunidade fitoplantónica para uma adaptação adequada da matriz de *input*, tal como referido por Irigoien et al. (2004) e Lima et al. (2019).

É também importante salientar que a escolha entre agrupar ou não classes taxonomicamente semelhantes deve ser encarada com precaução. Apesar da análise de correlação indicar que G1, G4 e G5 são os grupos que apresentam melhores resultados, tal não é consistente com a análise das diferenças médias e similaridade de Bray-Curtis, que indicam o contrário. A comparação direta entre os resultados do CHEMTAX e os valores de Chl *a* estimada parece indicar que em G1, G4 e G5, principalmente para Hapto, existe um elevado número de falsos positivos, i.e., o CHEMTAX apresenta concentrações elevadas quando não existem células dessa classe na amostra. Considerando que 80% das amostras utilizadas neste trabalho têm valores baixos de abundância de Hapto, e portanto de Chl *a* associada a este grupo, o agrupamento das classes taxonomicamente semelhantes poderá ser a melhor opção, à semelhança do indicado pelos resultados das similaridade de Bray-Curtis. No entanto, ainda em relação às Hapto, se a classe de interesse for por exemplo as Hapto6, então a melhor opção é considerar esta classe separadamente no CHEMTAX (Anexo Tabela A8).

Outro aspecto a ter em atenção refere-se às implicações causadas pela interação entre grupos. Por exemplo, neste estudo, quando as Hapto foram separadas nos seus diferentes tipos, os resultados obtidos foram melhores, no entanto, afetaram, geralmente de forma negativa, os resultados para as Diatom pois os rácios Pigmento/Chl *a*, e a composição pigmentar entre estes dois grupos, são muito semelhantes. O mesmo acontece com as Cyano, contudo, de forma inversa. Quando se separam as

Chloro das Prasino, as Cyano apresentam, para determinados testes, valores de correlação mais elevados, do que quando se consideram as Chloro e Prasino juntas (Chloro+Prasino).

De uma forma geral, para todos os grupos, exceto Hapto (valores de correlação médios de 0.59), obtiveram-se valores de correlação elevados para todos os testes, ou seja, valores médios acima de 0.78. O grupo Dino, grupo maioritário nas misturas utilizadas, representando 38.08% do total de Chl *a*, foi o que apresentou melhores resultados para todas as variações realizadas. Tal aconteceu porque a sua composição pigmentar é bastante distinta, quando comparado com os restantes grupos, possuindo a Peridininina e Dincoxantina como pigmentos diagnosticantes.

#### 4.2. Variação de Pigmentos

Tal como para os grupos, discutidos na secção anterior, Mackey et al. (1997), aconselha que a escolha dos pigmentos seja feita de forma cautelosa, uma vez que estes irão representar um determinado grupo taxonómico. Assim, os rácios entre os vários pigmentos e Chl *a* escolhidos para figurar na matriz de *input* devem ser estáveis entre espécies do mesmo *taxon* e/ou corresponder às espécies dominantes. Schlüter et al. (2000) refere que é importante utilizar rácios das espécies dominantes do grupo introduzido no CHEMTAX e que, mesmo na ausência de pigmentos diagnosticantes, o CHEMTAX apresentará resultados robustos. Estes autores testaram a influência da luz e nutrientes nos rácios pigmento/Chl *a* e, consequentemente, na identificação e quantificação dos grupos fitoplanctónicos através da análise de pigmentos. O mesmo verificou Mackey et al., (1998) ao testar a influência dos rácios pigmento/Chl *a* no CHEMTAX. No entanto, vários autores referem dificuldades na escolha dos pigmentos e respectivos rácios a incluir na análise CHEMTAX.

Landry et al. (2000), por exemplo, detetou dificuldades na identificação de dinoflagelados pois este grupo é identificado pela presença do pigmento peridininina, exclusivo de Dino tipo 1 (Roy et al. 2011). No entanto não ocorre nos restantes tipos de dinoflagelados. Também Irigoien et al. (2004) reportou problemas com os grupos dos dinoflagelados e das haptófitas, uma vez que as elevadas concentrações de fucoxantina foram identificadas como pertencentes apenas a diatomáceas, no entanto, mais uma vez, este é um pigmento comum a diversos *taxa* (linhagem das algas vermelhas), apesar de ser um pigmento normalmente utilizado como indicador das diatomáceas.

De acordo com Mackey et al. (1996, 1997) é recomendado o uso de mais do que um pigmento por *taxon*, e que o número de pigmentos usados seja superior ao número de *taxa* introduzidos na matriz de *input*. Isto obriga muitas vezes ao uso de pigmentos instáveis, isto é, pigmentos em que o rácio varia muito, por exemplo os pigmentos maioritários zeaxantina nas Cyano (Wojtasiewicz & Stoń-Egiert 2016), ou luteína nas Chloro (Grant 2006), pertencentes ao ciclo das Xantofilas, ou a pigmentos fotoprotectores, carotenoides de rápida degradação como a aloxantina associada a criptófitas (Louda 2008, Grant & Louda 2010), o que leva a um aumento da dificuldade do método responder corretamente às abundâncias e rácios. Por este motivo é muito comum que os investigadores não sigam esta recomendação (e.g. (Lewitus et al. 2005, Lionard et al. 2008, Lima et al. 2019)). Segundo Lima et al. (2019), a zeaxantina é a melhor opção para identificação das Cyano pois é o único pigmento transversal ao *taxon* e os pigmentos diagnosticantes únicos são muito variáveis e nem sempre estão presentes ou são identificados por HPLC (eg. mixoxantofila e equinenona, neste trabalho, identificados como pigmentos minoritários). Apesar desta ser a sugestão mais seguida, isto é as Cyano serem identificadas com o pigmento zeaxantina, este trabalho mostrou a importância da inclusão de pigmentos minoritários devido à existência de Cyano sem zeaxantina, apesar de mais raras, já identificadas por outros autores como Wojtasiewicz and Stoń-Egiert (2016) e também por este pigmento estar presente noutros grupos, como e.g. nas criptófitas.

Mais especificamente, neste estudo, o grupo Cyano foi dominada por uma única espécie, *Nodularia harvayana*, que apresenta pigmentos diagnosticantes do *taxon* (equinenona e mixoxantofila), facilitando a sua identificação. No entanto, durante a introdução dos pigmentos no CHEMTAX, a ausência do pigmento zeaxantina nesta espécie poderia ter sido um problema. Isto é, ao analisar a matriz de pigmentos foi clara a presença de cianófitas pela presença de pigmentos como a equinenona (pigmento minoritário exclusivo das Cyano tipo 1 e tipo 2) ou a mixoxantofila (pigmento maioritário exclusivo das Cyano tipo 1). A zeaxantina, que apesar de ser um pigmento comum em todas as linhagens, é geralmente utilizada como diagnosticante deste *taxon*, estava no entanto ausente na análise pigmentar desta espécie. Ou seja, a zeaxantina presente nas amostras não é indicativa da presença deste grupo pois o seu padrão pigmentar não contém zeaxantina. Ao introduzir no CHEMTAX a matriz habitual/*standard* para este grupo, correspondente aos testes Lit\_sM, este grupo foi subestimado pois foi identificado pela zeaxantina, que não o constitui. No entanto, ao proceder do mesmo modo com os pigmentos Cult, isto é, Cult\_sM, este foi sobrestimado pois mantém apenas  $\beta\beta$ -caroteno, pigmento presente em todos os restantes grupos analisados.

Este trabalho mostra que a utilização de pigmentos minoritários é crítica na correta distribuição da Chl *a* pelos diferentes grupos. Existe uma diminuição consistente da qualidade dos resultados obtidos quando se removem estes pigmentos, verificando-se uma redução na similaridade média de 6%. Estes resultados foram mais evidentes no *taxon* Cyano.

Por outro lado, a remoção de pigmentos de confundimento (pigmentos que podem criar confusão na análise), como sugerido por Mackey et al. (1996), não parece conferir melhorias nos resultados. No entanto, isto deve ser visto caso a caso após a escolha mais adequada dos grupos a introduzir, principalmente por nem sempre estarem disponíveis pigmentos minoritários. Esta sugestão tem sido seguida por vários autores *e.g.* Schlüter et al. (2000,) Lewitus et al. (2005), Llewellyn et al. (2005).

#### 4.3. Variação na Origem dos Rácios

Neste estudo foram avaliadas diferentes origens dos rácios a introduzir na matriz de *input*, nomeadamente: i) rácios de origem de culturas (Cult), isto é, de rácios pigmento/Chl *a* obtidos através do cultivo de monoculturas; ii) rácios de origem bibliográfica (Lit). É importante notar que os rácios da bibliografia utilizados foram também rácios referentes a culturas e não referentes a amostras naturais, seguindo as recomendações de Mackey et al. 1996, Jeffrey et al. 1999, Llewellyn et al. 2005, Kozłowski et al. 2011, que referem que se devem procurar rácios de condições semelhantes à da base de dados. Diferenças mais marcadas poderiam ter sido obtidas caso se utilizasse rácios de amostras naturais de diferentes regiões, visto existir uma grande variação a nível pigmentar das espécies conforme o local de recolha. No entanto, tal não foi efetuado, uma vez que se considerou que as diferenças regionais poderiam introduzir outros fatores de variação que seriam difíceis de controlar no contexto deste estudo. Por outro lado, não foi apenas o afinamento da pesquisa que reduziu as diferenças entre Cult e Lit, como também a abordagem, pois a partir do momento em que a matriz de *input* é bem definida, isto é, os grupos e pigmentos são bem definidos, qualquer uma das abordagens consegue corrigir o problema dos rácios, como explicado na secção seguinte (4.4. Variação da abordagem).

De acordo com a literatura, os rácios de alguns pigmentos em relação à Chl *a* têm uma elevada variação, não só entre grupos, como também dentro dos mesmos grupos e ainda dentro da mesma espécie (Stolte et al. 2000, Zapata et al. 2004, Laza-Martinez et al. 2007, Schlüter et al. 2011), o que também foi verificado neste estudo (ver Tabela 2.12). Higgins et al. (2011) diz ainda que mesmo conhecendo as espécies da população em amostras naturais não se consegue ter os rácios

pigmento/Chl *a* com precisão. Esta variação, como já foi referido anteriormente, deve-se a fatores como luz (e.g. (Wojtasiewicz & Stoń-Egiert 2016)), nutrientes (Schlüter et al. 2000) e estado fisiológico das células (Stolte et al. 2000, Armbrecht et al. 2015, Lima et al. 2019). Por esse motivo seria de esperar que os testes que utilizaram os rácios obtidos através de análise de culturas permitissem a otimização dos resultados, pois os dados de base deste trabalho são culturas. Neste estudo, as diferenças seriam mais marcadas nos *taxa* das Cyano, Chloro+Prasino e Hapto pois apresentaram uma diferença entre rácios de Cult e Lit superior. No entanto, tal não se verificou, uma vez que os resultados obtidos mostraram resultados semelhantes, com valores de similaridade de cerca de 77%, e uma diferença média entre misturas de cerca de 3%, utilizando rácios com origem na literatura ou da análise das culturas utilizadas. O mesmo já havia sido observado por outros autores, como por exemplo Schlüter et al. (2000), para dados de campo, e culturas do local. No entanto, para Cyano verificou-se que as maiores diferenças relativas foram obtidas com a utilização dos rácios Cult (7%), com uma diferença de 4% para os valores de Lit, apesar dos valores de correlação para este grupo indicarem piores resultados para os testes de Lit (0.73), com uma diferença de cerca de 0.2 de correlação para os testes Cult. É de notar que esta diferença se deve à remoção dos pigmentos minoritários, questão abordada na secção 4.2. (Variação de pigmentos).

#### 4.4. Variação da abordagem

Apesar de, neste estudo, a variação entre a origem dos rácios não se mostrar influente nos resultados finais, a escolha da abordagem está dependente da origem dos rácios. Neste caso, a abordagem W (abordagem proposta por Wright et al. (2009) ) permitiu melhores resultados quando se escolheu utilizar rácios de Cult. Tanto na abordagem L (abordagem proposta por Latasa (2007)) como WL (abordagem que combina W e L) são utilizadas sucessivas corridas sobre as mesmas matrizes de *input* para otimizar os resultados, ao contrário do que acontece na abordagem W, na qual são utilizadas apenas diferentes matrizes de *input*. Segundo Latasa (2007), testando 8 diferentes matrizes de *input* num conjunto de amostras artificiais, construída a partir de rácios conhecidos, as corridas sucessivas resolvem os problemas com rácios de origem Lit, pois independentemente da matriz, este consegue a convergência e estabilização dos rácios para a maioria dos grupos de fitoplâncton. Isto foi verificado através dos valores de Similaridade de Bray Curtis onde se obteve para L e WL uma similaridade de aproximadamente 78%, e para W de 76%. No entanto, quando se utilizam rácios conhecidos, isto é, de origem Cult, a abordagem W apresenta um melhor desempenho, 80% similaridade contra 75% e 76% de similaridade para L e WL, respetivamente. Ou seja, quando se conhecem os rácios, corridas sucessivas têm tendência a piorar os resultados, no entanto, quando se faz uma análise sem conhecimento *a priori* da composição pigmentar das espécies das amostras, o melhor será utilizar abordagens com corridas sucessivas que permitem um aumento na semelhança. Isto acontece pois W trará menos mudança nos rácios quando comparado com WL ou L, que ao utilizar-se rácios conhecidos não serão necessárias.

Em suma, a escolha da abordagem deve depender da origem dos rácios utilizados e dos grupos selecionados. Ou seja, a escolha da abordagem apenas é relevante após a escolha mais adequada da matriz, se esta escolha for efetuada às cegas, isto é, sem qualquer informação *a priori*, ou análise de amostras, a escolha da abordagem não será relevante, por si só.

#### 4.5. Fatores não testados com influência no output do CHEMTAX

É importante notar que Mackey et al. (1996) referiu que geralmente existem três situações em que a utilização da análise CHEMTAX pode suscitar problemas: i) quando a base de dados contém erros, isto é, *outliers* ou erros analíticos, ii) quando a matriz de rácios de input não está otimizada, isto é, quando a escolha dos pigmentos, grupos, e rácios não é feita da melhor forma, e iii) na presença de grupos minoritários. Este trabalho teve como objetivo avaliar principalmente o segundo ponto, no

entanto, é preciso não esquecer que o primeiro ponto pode também ter elevada relevância. Para os resultados não serem influenciados por possíveis erros na base dados, esta foi sempre a mesma. Também se optou por utilizar sempre definições *default* nas várias corridas do CHEMTAX, não sendo uma fonte de erro nas avaliações efetuadas. Para além disso foram seguidas as sugestões de Mackey et al. (1996) que permitiam a minimização destes erros. Segundo Latasa et al. (1996) os erros na base dados são, geralmente, inferiores a 20%, podendo, segundo os autores, ser descartados da análise.

É também recomendado que a matriz de dados seja agrupada de forma homogénea, eliminando qualquer fator conhecido que afete os rácio pigmentares. O agrupamento pode ser feito por região amostrada (Wright et al. 1996), massa de água, profundidade (Vaillancourt et al. 2018), luminosidade (Schlüter et al. 2000), concentração em Chl *a*, assinatura pigmentar das amostras (Schlüter & Møhlenberg 2003), e classe de tamanho do fitoplâncton (Schlüter & Møhlenberg 2003, Not et al. 2007). Tal não foi efetuado, pois as culturas utilizadas encontravam-se todas às mesmas condições ambientais. Para além disso, o número relativamente baixo de amostras não permitiria a divisão da matriz de dados, já que o programa não responde corretamente a um número pequeno de amostras (Mackey et al. 1997).

# Capítulo 5

**Conclusão**

O HPLC-CHEMTAX provou ser uma ferramenta robusta na reconstrução adequada da composição das comunidades fitoplantónicas, após a seleção adequada dos dados a introduzir na matriz de *input*. Este estudo permitiu perceber quais os pontos importantes a ter em consideração de forma a utilizar este método com o mínimo de erro associado, permitindo também reunir uma lista de recomendações para aplicações futuras de forma a que outros autores possam: i) melhorar o desempenho da análise; e ii) isolar e corrigir os pontos fracos da sua análise.

Com este estudo, conclui-se que as diferenças encontradas na análise CHEMTAX são maiores quando a escolha dos grupos a introduzir na matriz de *input* é desadequada e quando os pigmentos minoritários não são utilizados. As restantes variações testadas, nomeadamente variações na origem dos rácios de *input* e variações na abordagem, não trazem grandes diferenças, estando ambas correlacionadas, isto é, estas devem ser escolhidas em conjunto. A abordagem permitirá corrigir desvios nos valores de rácio. Este estudo permitiu detectar lacunas na bibliografia quanto a estudos de avaliação do desempenho do CHEMTAX em condições controladas, ou seja, mostrou a necessidade de mais estudos essencialmente utilizando amostras com composição conhecida.

Conclui-se ainda que *taxa* com grande semelhança pigmentar serão aqueles que trarão mais confusão à análise HPLC-CHEMTAX, neste caso haptófitas e diatomáceas. O *taxon* dinoflagelados mostrou-se o menos suscetível a erros, e interferência por parte dos restantes grupos. As espécies pertencentes a cada *taxon* têm uma elevada variação nos rácios pigmentares, sendo mais adequada a utilização de médias para estes valores.

Uma análise mais detalhada da constituição dos grupos seria relevante, incluindo mais *taxa* e fazendo mais variações, *e.g.*: i) Chloro2+Prasino2 deixando em separado a Prasino1, e ii) Hapto e Diatom juntas. Testes na variação de rácios também poderiam ser melhorados utilizando rácios de origem Lit no entanto sem aproximar às condições em estudo, isto é, literatura de amostras naturais. uma vez que aumentaria a diferença entre rácios, tornando as diferenças mais semelhantes à utilização de rácios de literatura para dados ambientais de locais distintos. Neste trabalho os rácios de Lit foram apenas escolhidos de modo a serem os mais próximos das amostras. Na variação de pigmentos, seria também importante testar a interação dos pigmentos minoritários e confundimento, isto é, sM+SC, para verificar se a remoção dos minoritários continua a ser relevante após a remoção dos pigmentos de confundimento.

Futuramente seria muito interessante testar o procedimento gerado em dados ambientais, para verificar a aplicabilidade das recomendações geradas. E atribuir valor de significância às diferenças encontradas, pois mais do que determinar a existência de diferenças em testes é verificar se estas diferenças são realmente significativas na magnitude dos resultados.

### 5.1. Recomendações

A partir deste trabalho, para uma utilização otimizada do programa CHEMTAX, recomenda-se a análise das amostras através de métodos tradicionais, tais como microscopia, para identificação das espécies presentes, e análise dos pigmentos obtidos por HPLC. Tal é essencial para uma correta identificação dos grupos a introduzir na matriz de *input* do CHEMTAX. Caso a identificação não seja conseguida, isto é, caso não se consiga chegar a nenhuma conclusão quanto aos **grupos** a introduzir na matriz, deve optar-se por utilizar os grupos o mais condensado possível, isto é, pelo *taxa* de maior ordem (*e.g.* divisão) e semelhança no conjunto pigmentar, tendo em conta o descrito para a região. A correta determinação dos grupos presentes na comunidade é essencial. Numa primeira fase, os esforços devem centrar-se nesta seleção.

Quanto à **abordagem**, a escolha deve depender dos rácios utilizados. Caso se opte pela utilização dos rácios das espécies nas amostras ou no caso em que haja certezas quanto aos rácios introduzidos, o mais correto será utilizar a abordagem W, proposta por Wright et al. (2009) que trará realmente melhores resultados. No entanto, a utilização de corridas sucessivas, isto é, WL ou L, é o mais recomendado caso não haja confiança nos rácios, pois poderá corrigir eventuais erros introduzidos nos valores de rácio. A abordagem WL apesar de ser a mais complexa, e requerer mais tempo para o processamento, é a que apresenta menos variações de resultados e resultados ligeiramente melhores, no entanto as diferenças encontradas entre WL e L são muito reduzidas.

A escolha de WL ou L permitirá a utilização de **rácios** bibliográficos, Lit, com um maior grau de confiança. O esforço de recriar as condições ambientais existentes no período da colheita da comunidade fitoplantónica, e o aumento dos custos e tempo de execução subjacente ao cultivo de espécies do local em estudo não é recomendada, pois não foram identificadas diferenças na utilização de rácios de Lit e Cult. Deve apenas manter-se a seleção dos rácios já otimizados em estudos anteriores o mais próximo possível da área em estudo, isto é, a obtenção destes rácios não deve ser feita de forma aleatória, mas tendo em conta a região e as espécies presentes nas amostras, pois as espécies têm uma elevada variação dos rácios intragrupo. Em suma, aconselha-se a utilização de rácios Lit.

A **escolha dos pigmentos** deve depender dos grupos, no entanto, a utilização dos pigmentos minoritários é essencial na análise pois estes permitirão a obtenção de melhores resultados. Por este motivo a otimização das técnicas de HPLC para obtenção dos pigmentos minoritários deve ser considerada tal como o uso *e.g.* da coluna C8 que permite a separação da Chl *c* importante para a separação dos *taxa* pertencentes à linhagem das algas vermelhas. O uso de tP (todos os pigmentos disponíveis) deve ser também utilizado com algum cuidado, pois obriga a utilização de rácios mais instáveis, uma vez que são incluídos não só pigmentos marcadores como também secundários geralmente considerados como confundimento. Neste estudo a sua remoção não mostrou ser uma mais valia.

É importante notar que estas sugestões não devem ser seguidas sem qualquer análise prévia das amostras, e conhecimento das possíveis variações, devendo ser seguidas com cuidado. As amostras devem ser analisadas caso a caso, já que os resultados são muito dependentes das diferenças entre amostras. Não esquecer que a quimiotaxonomia é favorecida pela combinação de vários métodos de análise e que os resultados dependem das combinações escolhidas.



## Referências

- ANDERSON, M J; GORLEY, R N; CLARKE, K R (2008) – PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. – *PRIMER-E* Plymouth, UK.
- ARMBRECHT, Linda H.; WRIGHT, Simon W.; PETOCZ, Peter; ARMAND, Leanne K. (2015) – A new approach to testing the agreement of two phytoplankton quantification techniques: Microscopy and CHEMTAX. *Limnology and Oceanography: Methods*. 13:8, pp. 425–437.
- ARMBRUST, E. Virginia (2009) – The life of diatoms in the world’s oceans. *Nature*. 459:7244, pp. 185–192.
- BAINS, Santo; NORRIS, Richard D.; CORFIELD, Richard M.; FAUL, Kristina L. (2000) – Termination of global warmth at the Palaeocene/Eocene boundary through productivity feedback. *Nature*. 407:6801, pp. 171–174.
- BARLOW, R.; STUART, V.; LUTZ, V.; SESSIONS, H.; SATHYENDRANATH, S.; PLATT, T.; KYEWALYANGA, M.; CLEMENTSON, L.; FUKASAWA, M.; WATANABE, S.; DEVRED, E. (2007) – Seasonal pigment patterns of surface phytoplankton in the subtropical southern hemisphere. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 54:10, pp. 1687–1703.
- BREWIN, Robert J.W.; SATHYENDRANATH, Shubha; HIRATA, Takafumi; LAVENDER, Samantha J.; BARCIELA, Rosa M.; HARDMAN-MOUNTFORD, Nick J. (2010) – A three-component model of phytoplankton size class for the Atlantic Ocean. *Ecological Modelling*. 221:11, pp. 1472–1483.
- BRITO, Ana C.; BROTAS, Vanda; CAETANO, Miguel; COUTINHO, Teresa P.; BORDALO, Adriano A.; ICELY, John; NETO, João M.; SERÔDIO, João; MOITA, Teresa (2012) – Defining phytoplankton class boundaries in Portuguese transitional waters: An evaluation of the ecological quality status according to the Water Framework Directive. *Ecological Indicators*. 19, pp. 5–14.
- BRITO, Ana C.; SÁ, Carolina; BROTAS, Vanda; BREWIN, Robert J.W.; SILVA, Teresa; VITORINO, João; PLATT, Trevor; SATHYENDRANATH, Shubha (2015a) – Effect of phytoplankton size classes on bio-optical properties of phytoplankton in the Western Iberian coast: Application of models. *Remote Sensing of Environment*. 156, pp. 537–550.
- BRITO, Ana C.; SÁ, Carolina; MENDES, Carlos R.; BRAND, Tim; DIAS, Ana M.; BROTAS, Vanda; DAVIDSON, Keith (2015b) – Structure of late summer phytoplankton community in the Firth of Lorn (Scotland) using microscopy and HPLC-CHEMTAX. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 167, pp. 86–101.
- BROTAS, Vanda; BREWIN, Robert J W; SÁ, Carolina; BRITO, Ana C.; SILVA, Alexandra; MENDES, Carlos Rafael; DINIZ, Tânia; KAUFMANN, Manfred; TARRAN, Glen; GROOM, Steve B.; PLATT, Trevor; SATHYENDRANATH, Shubha (2013) – Deriving phytoplankton size classes from satellite data: Validation along a trophic gradient in the eastern Atlantic Ocean. *Remote Sensing of Environment*. 134, pp. 66–77.
- CLARKE, K R; GORLEY, R N (2006) – Plymouth routines in multivariate ecological research. PRIMER v6: Use manual/Tutorial. *PRIMER-E: Plymouth*. p. 190.
- DONEY, Scott C. (2006) – The Dangers of Ocean Acidification. *Scientific American*. 294:3, pp. 58–65.
- EVERITT, D. A.; WRIGHT, S. W.; VOLKMAN, J. K.; THOMAS, D. P.; LINDSTROM, E. J. (1990) – Phytoplankton community compositions in the western equatorial Pacific determined from chlorophyll and carotenoid pigment distributions. *Deep Sea Research Part A, Oceanographic Research Papers*. 37:6, pp. 975–997.

- FALKOWSKI, Paul G. (1994) – The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynthesis Research*. 39:3, pp. 235–258.
- FALKOWSKI, Paul G.; BARBER, Richard T.; SMETACEK, Victor (1998) – Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*. 281:1998, pp. 200–206.
- FALKOWSKI, Paul G.; RAVEN, John A. (2007) – An Introduction to Photosynthesis in Aquatic Systems. – *Aquatic Photosynthesis* Princeton University Press, pp. 1–43 (Second Edi).
- FALKOWSKI, Paul G.; WOODHEAD, Avril D. (Eds.) (1992) – *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*. – *Environmental science Research* Springer Science + Business Media, LLC.
- FINKEL, Zoe V.; BEARDALL, John; FLYNN, Kevin J.; QUIGG, Antonietta; REES, T. Alwyn V.; RAVEN, John A. (2010) – Phytoplankton in a changing world: Cell size and elemental stoichiometry. *Journal of Plankton Research*. 32:1, pp. 119–137.
- GARIBOTTI, Irene A.; VERNET, María; KOZLOWSKI, Wendy A.; FERRARIO, Martha E. (2003) – Composition and biomass of phytoplankton assemblages in coastal Antarctic waters: A comparison of chemotaxonomic and microscopic analyses. *Marine Ecology Progress Series*. 247, pp. 27–42.
- GIESKES, W. W. C.; KRAAY, G. W. (1983a) – Dominance of Cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the central North Sea detected by HPLC analysis of pigments. *Marine Biology*. 75, pp. 179–185.
- GIESKES, Winfried W.; KRAAY, Gijsbert W. (1983b) – Unknown chlorophyll a derivatives in the North Sea and the tropical Atlantic Ocean revealed by HPLC analysis1. *Limnology and Oceanography*. 28:4, pp. 757–766.
- GLIBERT, Patricia M. (2016) – Margalef revisited: A new phytoplankton mandala incorporating twelve dimensions, including nutritional physiology. *Harmful Algae*. 55:May, pp. 25–30.
- GOELA, P. C.; DANCHENKO, S.; ICELY, J. D.; LUBIAN, L. M.; CRISTINA, S.; NEWTON, A. (2014) – Using CHEMTAX to evaluate seasonal and interannual dynamics of the phytoplankton community off the South-west coast of Portugal. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 151, pp. 112–123.
- GOERICKE, Ralf (1998) – Response of phytoplankton community structure and taxon-specific growth rates to seasonally varying physical forcing in the Sargasso Sea off Bermuda. *Limnology and Oceanography*. 43:5, pp. 921–935.
- GRAHAM, Linda E.; WILCOX, Lee Warren (2000) – *Algae*. Upper Saddle River; Prentice Hall.
- GRANT, C. S.; LOUDA, J. W. (2010) – Microalgal pigment ratios in relation to light intensity: Implications for chemotaxonomy. *Aquatic Biology*. 11:2, pp. 127–138.
- GRANT, Cidya S (2006) – Photosynthetic Pigment Ratios in Relation to Photic Flux. Master Thesis.
- GUILLARD, Robert R. L. (1975) – Division rates. In STEIN, Janet R., ed. – *Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements* Cambridge University Press.
- GUISANDE, Cástor; MANEIRO, Isabel; RIVEIRO, Isabel; BARREIRO, Aldo; PAZOS, Yolanda (2002) – Estimation of copepod trophic niche in the field using amino acids and marker pigments. *Marine Ecology Progress Series*. 239:August, pp. 147–156.
- HAGERTHEY, Scot E.; WILLIAM LOUDA, J.; MONGKRONSR, Panne (2006) – Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton chlorophyll a determination and chemotaxonomic assessment. *Journal of Phycology*. 42:5, pp. 1125–1136.

- HAYS, Graeme C.; RICHARDSON, Anthony J.; ROBINSON, Carol (2005) – Climate change and marine plankton. *Trends in Ecology and Evolution*. 20:6 SPEC. ISS., pp. 337–344.
- HERNÁNDEZ, Francisco José Rodríguez (2001) – Aplicación del análisis de pigmentos por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) al estudio de la composición y distribución del fitoplancton marino. PHD Thesis.
- HIGGINS, Harry W.; WRIGHT, Simon W.; SCHLÜTER, Louise (2011) – Quantitative interpretation of chemotaxonomic pigment data. In ROY, Suzanne, LLEWELLYN, Carole, EGELAND, Einar Skarstad & JOHNSEN, Geir, eds. – *Phytoplankton Pigments* Cambridge: Cambridge University Press, pp. 257–313.
- HILLEBRAND, Helmut; DÜRSELEN, Claus Dieter; KIRSCHTEL, David; POLLINGHER, Uta; ZOHARY, Tamar (1999) – Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*. 35:2, pp. 403–424.
- IOCCG (2014) – Phytoplankton Functional Types from Space. – *Reports of the International Ocean Colour Coordinating Group* Dartmouth, Canada.
- IPCC (2014) – Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, R.K. Pachauri and L.A. Meyer (eds.)]. Geneva, Switzerland: Cambridge University Press.
- IRIGOIEN, Xabier; MEYER, Bettina; HARRIS, Roger; HARBOUR, Derek (2004) – Using HPLC pigment analysis to investigate phytoplankton taxonomy: the importance of knowing your species. *Helgoland Marine Research*. 58:2, pp. 77–82.
- JEFFREY, S. W.; WRIGHT, S. W.; ZAPATA, M. (1999) – Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*. 50:8, pp. 879–896.
- JEFFREY, S.W.; MANTOURA, R.F.C.; WRIGHT, S.W. (Eds.) (1997) – *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. Paris: UNESCO.
- JODŁOWSKA, Sabina; LATAŁA, Adam (2011) – The Comparison of Spectrophotometric Method and High-Performance Liquid Chromatography in Photosynthetic Pigments Analysis. *Online Journal of Biological Sciences*. 11:2, pp. 63–69.
- KIRK, John T.O. (2011) – *Light and photosynthesis in aquatic ecosystems*. (J. T. O. Kirk, Ed.) Cambridge University Press (Third).
- KOZŁOWSKI, Wendy A.; DEUTSCHMAN, Douglas; GARIBOTTI, Irene; TREES, Charles; VERNET, Maria (2011) – An evaluation of the application of CHEMTAX to Antarctic coastal pigment data. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 58:4, pp. 350–364.
- KRAAY, Gijbert W.; ZAPATA, Manuel; VELDHUIS, Marcel J. W. (1992) – Separation of chlorophylls c1, c2 and c3 of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Phycology*. 28:5, pp. 708–712.
- DE LA ROCHA, C. L. (2006) – The Biological Pump. In ELDERFIELD, Henry, HOLLAND, Heinrich D. & TUREKIAN, Karl K., eds. – *The Oceans and Marine Geochemistry* UK: Elsevier.
- LANDRY, M. R.; ONDRUSEK, M. E.; TANNER, S. J.; BROWN, S. L.; CONSTANTINOU, J.; BIDIGARE, R. R.; COALE, K. H.; FITZWATER, S. (2000) – Biological response to iron fertilization in the eastern equatorial Pacific (IronEx II). I. Microplankton community abundances and biomass. *Marine Ecology Progress Series*. 201, pp. 27–42.
- LATASA, Mikel (2007) – Improving estimations of phytoplankton class abundances using CHEMTAX. *Marine Ecology Progress Series*. 329:11, pp. 13–21.
- LATASA, Mikel; BIDIGARE, Robert R.; ONDRUSEK, Michael E.; KENNICUTT, Mahlon C. (1996) – HPLC analysis of algal pigments: a comparison exercise among laboratories and

- recommendations for improved analytical performance. *Marine Chemistry*. 51:4, pp. 315–324.
- LAZA-MARTINEZ, Aitor; SEOANE, Sergio; ZAPATA, Manuel; ORIVE, Emma (2007) – Phytoplankton pigment patterns in a temperate estuary: From unialgal cultures to natural assemblages. *Journal of Plankton Research*. 29:11, pp. 913–929.
- LETELIER, R M; BIDIGARE, R R; HEBEL, D V; ONDRUSEK, M; WINN, C D; KARL, D M (1993) – Temporal Variability of Phytoplankton Community Structure-Based on Pigment Analysis. *Limnology and Oceanography*. 38:7, pp. 1420–1437.
- LEWITUS, Alan J.; WHITE, David L.; TYMOWSKI, Raphael G.; GEESEY, Mark E.; HYMEL, Sabrina N.; NOBLE, Peter A. (2005) – Adapting the CHEMTAX Method for Assessing Phytoplankton Taxonomic Composition in Southeastern U . S . Estuaries. *Estuaries*. 28:1, pp. 160–172.
- LIMA, Camila Rodrigues; MENDES, Carlos Rafael Borges; TAVANO, Virginia Maria; DETONI, Amália Maria Sacilotto; SECCHI, Eduardo Resende (2019) – Chemotaxonomy-based mapping of phytoplankton communities in the subtropical Southwestern Atlantic Ocean, with emphasis on the marine cyanobacterium *Trichodesmium*. *Progress in Oceanography*. 172, pp. 77–88.
- LIONARD, Marie; MUYLAERT, Koenraad; TACKX, Michèle; VYVERMAN, Wim (2008) – Evaluation of the performance of HPLC-CHEMTAX analysis for determining phytoplankton biomass and composition in a turbid estuary ( Schelde , Belgium ). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 76:4, pp. 809–817.
- LLEWELLYN, Carole A.; FISHWICK, James R.; BLACKFORD, Jerry C. (2005) – Phytoplankton community assemblage in the English Channel: A comparison using chlorophyll a derived from HPLC-CHEMTAX and carbon derived from microscopy cell counts. *Journal of Plankton Research*. 27:1, pp. 103–119.
- LOUDA, J. William (2008) – HPLC-based chemotaxonomy of Florida Bay phytoplankton: Difficulties in coastal environments. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 31:3, pp. 295–323.
- MACKEY, D. J.; HIGGINS, H. W.; MACKEY, M. D.; HOLDSWORTH, D. (1998) – Algal class abundances in the western equatorial Pacific: Estimation from HPLC measurements of chloroplast pigments using CHEMTAX. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 45:9, pp. 1441–1468.
- MACKEY, Mark D.; HIGGINS, Harry W.; MACKEY, Denis J.; WRIGHT, Simon W. (1997) – CHEMTAX user's Manual: a program for estimating class abundances from chemical markers - application to HPLC measurements of phytoplankton pigments. – *CSIRO Marine Laboratories* Hobart, Australia.
- MACKEY, MD; MACKEY, DJ; HIGGINS, HW; WRIGHT, SW (1996) – CHEMTAX - a program for estimating class abundances from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*. 144:5, pp. 265–283.
- MALIN, G; KIRST, Go (1997) – Algal Production of Dimethyl Sulfide and Its Atmospheric Role. *Journal of Phycology*. 33:6, pp. 889–896.
- MALIN, Gill; STEINKE, Michael (2004) – Dimethyl sulfide production: what is the contribution of the coccolithophores? – *Coccolithophores* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 127–164.
- MARGALEF, Ramon (1978) – Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Oceanologica Acta*. 1, pp. 493–509.
- VAN DEN MEERSCHKE, Karel; SOETAERT, Karline; MIDDELBURG, Jack J. (2008) – A Bayesian compositional estimator for microbial taxonomy based on biomarkers. *Limnology and*

- MENDES, Carlos R.; CARTAXANA, Paulo; BROTAS, Vanda (2007) – HPLC determination of phytoplankton and microphytobenthos pigments: Comparing resolution and sensitivity of a C18 and a C8 method. *Limnology and Oceanography: Methods*. 5:10, pp. 363–370.
- MENDES, Carlos Rafael Borges; ODEBRECHT, Clarisse; TAVANO, Virginia Maria; ABREU, Paulo Cesar (2016) – Pigment-based chemotaxonomy of phytoplankton in the Patos Lagoon estuary (Brazil) and adjacent coast. *Marine Biology Research*. 13:1, pp. 22–35.
- MENDES, Carlos Rafael; SÁ, Carolina; VITORINO, João; BORGES, Carlos; GARCIA, Virginia Maria Tavano; BROTAS, Vanda; TAVANO GARCIA, Virginia Maria; BROTAS, Vanda (2011) – Spatial distribution of phytoplankton assemblages in the Nazaré submarine canyon region (Portugal): HPLC-CHEMTAX approach. *Journal of Marine Systems*. 87, pp. 90–101.
- MILLIE, David F.; PAERL, Hans W.; HURLEY, James P. (1993) – Microalgal Pigment Assessments Using High-Performance Liquid Chromatography: A Synopsis of Organismal and Ecological Applications. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 50:11, pp. 2513–2527.
- MIRKOVIC, Tihana; OSTROUMOV, Evgeny E.; ANNA, Jessica M.; VAN GRONDELLE, Rienk; GOVINDJEE; SCHOLLES, Gregory D. (2017) – Light absorption and energy transfer in the antenna complexes of photosynthetic organisms. *Chemical Reviews*. 117:2, pp. 249–293.
- MOISAN, Tiffany A.H.; SATHYENDRANATH, Shubha; BOUMAN, Heather A. (2012) – *Ocean Color Remote Sensing of Phytoplankton Functional Types*. (Lola Fatoyinbo, Ed.) – *Remote Sensing of Biomass - Principles and Applications* InTech.
- NAIR, Anitha; SATHYENDRANATH, Shubha; PLATT, Trevor; MORALES, Jesus; STUART, Venetia; FORGET, Marie Hélène; DEVRED, Emmanuel; BOUMAN, Heather (2008) – Remote sensing of phytoplankton functional types. *Remote Sensing of Environment*. 112:8, pp. 3366–3375.
- NORICI, Alessandra; DALSASS, Alessia; GIORDANO, Mario (2002) – Role of phosphoenolpyruvate carboxylase in anaplerosis in the green microalga *Dunaliella salina* cultured under different nitrogen regimes. *Physiologia Plantarum*. 116:2, pp. 186–191.
- NOT, Fabrice; ZAPATA, Manuel; PAZOS, Yolanda; CAMPAÑA, Emilia; DOVAL, Marylo; RODRÍGUEZ, Francisco (2007) – Size-fractionated phytoplankton diversity in the NW Iberian coast: A combination of microscopic, pigment and molecular analyses. *Aquatic Microbial Ecology*. 49:3, pp. 255–265.
- OLENINA, Irina; HAJDU, Susanna; EDLER, Lars; WASMUND, Norbert; BUSCH, Susanne; GÖBEL, Jeanette; GROMISZ, Slawomira; HUSEBY, Siv; HUTTUNEN, Maija; JAANUS, Andres; KOKKONEN, Pirkko; LEDAINE, Iveta; NIEMKIEWICZ, Elzbieta (2006) – Biovolumes and size-classes of phytoplankton in the Baltic Sea. *HELCOM Balt. Sea Environ. Proc.* 106:106, p. 144 pp.
- OLOFSSON, Malin; ROBERTSON, Elizabeth K.; EDLER, Lars; ARNEBORG, Lars; WHITEHOUSE, Martin J.; PLOUG, Helle (2019) – Nitrate and ammonium fluxes to diatoms and dinoflagellates at a single cell level in mixed field communities in the sea. *Scientific Reports*. 9:1, pp. 1–12.
- ÖRNÓLFSDÓTTIR, Erla Björk; PINCKNEY, James L; TESTER, Patricia A (2003) – Quantification of the relative abundance of the toxic dinoflagellate, *Karenia brevis* (Dinophyta), using unique photopigments. *Journal of Phycology*. 39:2, pp. 449–457.
- PHATARPEKAR, P. V.; SREEPADA, R. A.; PEDNEKAR, Chhaya; ACHUTHANKUTTY, C. T. (2000) – A comparative study on growth performance and biochemical composition of mixed culture of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans* with monocultures. *Aquaculture*. 181:1–2, pp. 141–155.

- PRICE, L. L.; YIN, K.; HARRISON, P. J. (1998) – Influence of continuous light and L:D cycles on the growth and chemical composition of Prymnesiophyceae including coccolithophores. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 223:2, pp. 223–234.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM (2019) – R: A language and environment for statistical computing.
- RAVEN, Peter H.; EVERT, Ray F.; EICHHORN, Susan E. (Eds.) (1996) – *Biologia Vegetal* (5th edition).
- REYNOLDS, Colin S. (2006) – *Ecology of Phytoplankton*. (M. Usher, D. Saunders, R. Peet, A. Dobson, P. Adam, H. J. B. Birks, L. Gustafsson, J. McNeely, R. T. Paine, D. Richardson, and J. Wilson, Eds.) Cambridge University Press.
- ROY, Suzanne; LLEWELLYN, Carole A; EGELAND, Einar Skarstad; JOHNSEN, Geir (Eds.) (2011) – *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. New York: Cambridge University Press.
- RUIVO, Mickael; AMORIM, Ana; CARTAXANA, Paulo (2011) – Effects of growth phase and irradiance on phytoplankton pigment ratios: Implications for chemotaxonomy in coastal waters. *Journal of Plankton Research*. 33:7, pp. 1012–1022.
- SÁ, C.; D'ALIMONTE, D.; BRITO, A. C.; KAJIYAMA, T.; MENDES, C. R.; VITORINO, J.; OLIVEIRA, P. B.; DA SILVA, J. C.B.; BROTAS, V. (2015) – Validation of standard and alternative satellite ocean-color chlorophyll products off Western Iberia. *Remote Sensing of Environment*. 168, pp. 403–419.
- SABATER, Sergi (2009) – The diatom cell and its taxonomical entity. *Encyclopedia of Inland Waters*. 1, pp. 149–156.
- SCHLÜTER, L.; MØHLENBERG, F.; HAVSKUM, H.; LARSEN, S. (2000) – The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: Testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Marine Ecology Progress Series*. 192, pp. 49–63.
- SCHLÜTER, L.; MØHLENBERG, F (2003) – Detecting presence of phytoplankton groups with non-specific pigment signatures. *Journal of Applied Phycology*. 15:1998, pp. 465–476.
- SCHLÜTER, Louise; HENRIKSEN, Peter; NIELSEN, Torkel Gissel; JAKOBSEN, Hans H. (2011) – Phytoplankton composition and biomass across the southern Indian Ocean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 58:5, pp. 546–556.
- SIEBURTH, John McN.; SMETACEK, Victor; LENZ, Jürgen (1978) – Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions 1. *Limnology and Oceanography*. 23:6, pp. 1256–1263.
- SILVA, A.; BROTAS, V.; VALENTE, A.; SÁ, C.; DINIZ, T.; PATARRA, R. F.; ÁLVARO, N. V.; NETO, A. I. (2013) – Coccolithophore species as indicators of surface oceanographic conditions in the vicinity of Azores islands. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 118, pp. 50–59.
- STOLTE, Willem; KRAAY, Gijsbert W.; NOORDELOOS, Anna A.M.; RIEGMAN, Roel (2000) – Genetic and physiological variation in pigment composition of *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae) and the potential use of its pigment ratios as a quantitative physiological marker. *Journal of Phycology*. 36:3, pp. 529–539.
- SUN, Jun; LIU, Dongyan (2003) – Geometric models for calculating cell biovolume and surface area for phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 25:11, pp. 1331–1346.
- SUTCLIFFE, Ana; BRITO, Ana C.; SÁ, Carolina; SOUSA, Fátima; BOUTOV, Dmitri; BROTAS, Vanda (2016) – *Observação da Terra: uso de imagens de temperatura da superfície do mar e cor do oceano para a monitorização de águas costeiras e oceânicas*. Lisboa, Portugal (DGRM-

Dir).

- UITZ, Julia; CLAUSTRE, Hervé; MOREL, André; HOOKER, Stanford B. (2006) – Vertical distribution of phytoplankton communities in open ocean: An assessment based on surface chlorophyll. *Journal of Geophysical Research*. 111:C8, p. C08005.
- VAILLANCOURT, Robert D.; LANCE, Veronica P.; MARRA, John F. (2018) – Phytoplankton chemotaxonomy within contiguous optical layers across the western North Atlantic Ocean and its relationship to environmental parameters. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 139, pp. 14–26.
- VIDUSSI, Francesca; MARTY, Jean-Claude; CHIAVÉRINI, Jacques (2000) – Phytoplankton pigment variations during the transition from spring bloom to oligotrophy in the northwestern Mediterranean sea. *Deep-Sea Research I*. 47, pp. 423–445.
- WHITMARSH, John; GOVINDJEE (1999) – The Photosynthetic Process. *Concepts in Photobiology*. pp. 11–51.
- WOJTASIEWICZ, Bożena; STON-EGIERT, Joanna (2016) – Bio-optical characterization of selected cyanobacteria strains present in marine and freshwater ecosystems. *Journal of Applied Phycology*. 28:4, pp. 2299–2314.
- WRIGHT, S. W.; THOMAS, D. P.; MARCHANT, H. J.; HIGGINS, H. W.; MACKEY, M. D.; MACKEY, D. J. (1996) – Analysis of phytoplankton of the Australian sector of the Southern Ocean: Comparisons of microscopy and size frequency data with interpretations of pigment HPLC data using the ‘CHEMTAX’ matrix factorisation program. *Marine Ecology Progress Series*. 144:1–3, pp. 285–298.
- WRIGHT, Simon W.; ISHIKAWA, Akira; MARCHANT, Harvey J.; DAVIDSON, Andrew T.; VAN DEN ENDEN, Rick L.; NASH, Geraldine V. (2009) – Composition and significance of picophytoplankton in Antarctic waters. *Polar Biology*. 32:5, pp. 797–808.
- WRIGHT, Simon W.; JEFFREY, Shirley W. (2006) – Pigment markers for phytoplankton production. *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 2: Reactions and Processes*. 2 N:September 2005, pp. 71–104.
- WRIGHT, SW; JEFFREY, SW; MANTOURA, RFC; LLEWELLYN, CA; BJORNLAND, T; REPETA, D; WELSCHMEYER, N (1991) – Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series*. 77:2–3, pp. 183–196.
- YENTSCH, Charles S; MENZEL, David W (1963) – A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts*. 10:3, pp. 221–231.
- ZAPATA, Manuel; JEFFREY, S. W.; WRIGHT, Simon W.; RODRÍGUEZ, Francisco; GARRIDO, José L.; CLEMENTSON, Lesley (2004) – Photosynthetic pigments in 37 species (65 strains) of Haptophyta: Implications for oceanography and chemotaxonomy. *Marine Ecology Progress Series*. 270, pp. 83–102.
- ZAPATA, Manuel; RODRÍGUEZ, Francisco; GARRIDO, José L. (2000) – Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: A new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series*. 195, pp. 29–45.

# Capítulo 6

**Anexos**



Tabela A1 Concentração de Chl a ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) de cada espécie por mistura

	3	4	6	8	10	12	13	15	19	20	21	25	26	28	29	31	32	34	35	Chl a estimada	Chl a HPLC
M1	0	938	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.19E+02	1257	1218
M2	0	0	0	0	0	3.38E+02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3.19E+02	6.57E+02	801
M3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8.31E+01	0	3.19E+02	402	3.60E+02
M5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	937	0	0	3.19E+02	1256	1449
M6	0	0	0	0	0	0	0	1.85E+02	0	0	0	0	0	0	0	937	0	0	0	1122	1.26E+03
M7	535	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	937	0	0	0	1472	1618
M8	0	0	0	0	542	0	0	1.85E+02	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	727	778
M12	3.57E+02	0	0	0	0	0	0	0	0	145	0	0	0	0	0	0	5.54E+01	0	0	557	7.54E+02
M13	3.57E+02	0	0	0	0	0	0	123	0	0	0	0	0	0	0	0	5.54E+01	0	0	5.35E+02	592
M14	0	0	0	0	0	226	0	0	0	0	0	0	0	0	1.39E+02	0	0	0	2.12E+02	5.77E+02	6.16E+02
M15	0	0	0	0	0	0	1121	0	0	0	1077	0	0	0	0	0	0	0	0	2198	1941
M16	0	0	0	0	0	0	747	0	0	0	718	0	2.40E+02	0	0	0	0	0	0	1705	1.79E+03
M17	0	0	0	679	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.39E+02	0	0	0	2.12E+02	1031	1048
M18	0	0	0	0	0	0	560	9.26E+01	0	0	0	0	1.80E+02	0	0	0	0	0	159	992	1258
M19	0	0	0	0	0	169	560	9.26E+01	0	0	0	0	1.80E+02	0	0	0	0	0	0	1002	1207
M20	0	0	0	0	0	0	560	9.26E+01	0	0	0	0	0	0	105	0	0	0	159	917	1034
M21	0	0	0	0	361	0	0	123	766	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1250	1006
M22	267	0	0	0	0	0	0	0	0	109	0	0	1.80E+02	0	105	0	0	0	0	661	723
M23	0	0	0	0	0	0	448	74	0	0	431	0	0	0	0	375	0	0	1.27E+02	1456	1475
M25	2.14E+02	0	0	0	0	0	0	0	0	8.71E+01	0	0	144	0	84	0	33	0	0	562	539
M26	2.14E+02	0	0	0	0	135	0	0	0	8.71E+01	0	0	144	0	84	0	0	0	0	6.64E+02	7.60E+02
M27	267	0	0	0	271	0	0	0	575	0	0	0	1.80E+02	0	0	0	0	0	0	1292	1421
M28	0	469	0	0	271	0	0	0	575	0	0	4.75E+02	0	0	0	0	0	0	0	1.79E+03	1534
M30	0	0	174	0	0	0	448	0	0	0	0	0	0	806	0	0	0	4.64E+02	0	1892	2258

Tabela A2 Número de células por litro de cada espécie por mistura

	3	10	13	15	19	20	21	26	29	31	Cell L <sup>-1</sup>
<b>M6</b>	0	0	0	4.58 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0	2.00 x10 <sup>7</sup>	4.78 x10 <sup>8</sup>
<b>M7</b>	5.00 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	2.00 x10 <sup>7</sup>	7.00 x10 <sup>7</sup>
<b>M8</b>	0	4.25 x10 <sup>7</sup>	0	4.58 x10 <sup>8</sup>	0	0	0	0	0	0	5.00 x10 <sup>8</sup>
<b>M15</b>	0	0	5.50 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	3.72 x10 <sup>9</sup>	0	0	0	3.77 x10 <sup>9</sup>
<b>M16</b>	0	0	3.67 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	2.48 x10 <sup>9</sup>	2.07 x10 <sup>6</sup>	0	0	2.52 x10 <sup>9</sup>
<b>M21</b>	0	2.83 x10 <sup>7</sup>	0	3.05 x10 <sup>8</sup>	2.43 x10 <sup>9</sup>	0	0	0	0	0	2.77 x10 <sup>9</sup>
<b>M22</b>	2.50 x10 <sup>7</sup>	0	0	0	0	1.43 x10 <sup>6</sup>	0	1.55 x10 <sup>6</sup>	8.56 x10 <sup>5</sup>	0	2.88 x10 <sup>7</sup>
<b>M27</b>	2.50 x10 <sup>7</sup>	2.13 x10 <sup>7</sup>	0	0	1.83 x10 <sup>9</sup>	0	0	1.55 x10 <sup>6</sup>	0	0	1.87 x10 <sup>9</sup>

Tabela A3 Biovolume (µm<sup>3</sup> L<sup>-1</sup>) de cada espécie por mistura

	3	10	13	15	19	20	21	26	29	31	µm <sup>3</sup> L <sup>-1</sup>
<b>M6</b>	0	0	0	2.42 x10 <sup>10</sup>	0	0	0	0	0	1.70 x10 <sup>11</sup>	1.94 x10 <sup>11</sup>
<b>M7</b>	1.74 x10 <sup>11</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	1.70 x10 <sup>11</sup>	3.44 x10 <sup>11</sup>
<b>M8</b>	0	1.88 x10 <sup>10</sup>	0	2.42 x10 <sup>10</sup>	0	0	0	0	0	0	4.29E+10
<b>M15</b>	0	0	4.83 x10 <sup>10</sup>	0	0	0	3.94 x10 <sup>11</sup>	0	0	0	4.43 x10 <sup>11</sup>
<b>M16</b>	0	0	3.22 x10 <sup>10</sup>	0	0	0	2.63 x10 <sup>11</sup>	2.12 x10 <sup>10</sup>	0	0	3.16 x10 <sup>11</sup>
<b>M21</b>	0	1.25 x10 <sup>10</sup>	0	1.61 x10 <sup>10</sup>	7.63 x10 <sup>10</sup>	0	0	0	0	0	1.05 x10 <sup>11</sup>
<b>M22</b>	8.71 x10 <sup>10</sup>	0	0	0	0	1.48 x10 <sup>10</sup>	0	1.59 x10 <sup>10</sup>	2.11 x10 <sup>11</sup>	0	3.28 x10 <sup>11</sup>
<b>M27</b>	8.71 x10 <sup>10</sup>	9.39 x10 <sup>9</sup>	0	0	5.72 x10 <sup>10</sup>	0	0	1.59 x10 <sup>10</sup>	0	0	1.70 x10 <sup>11</sup>

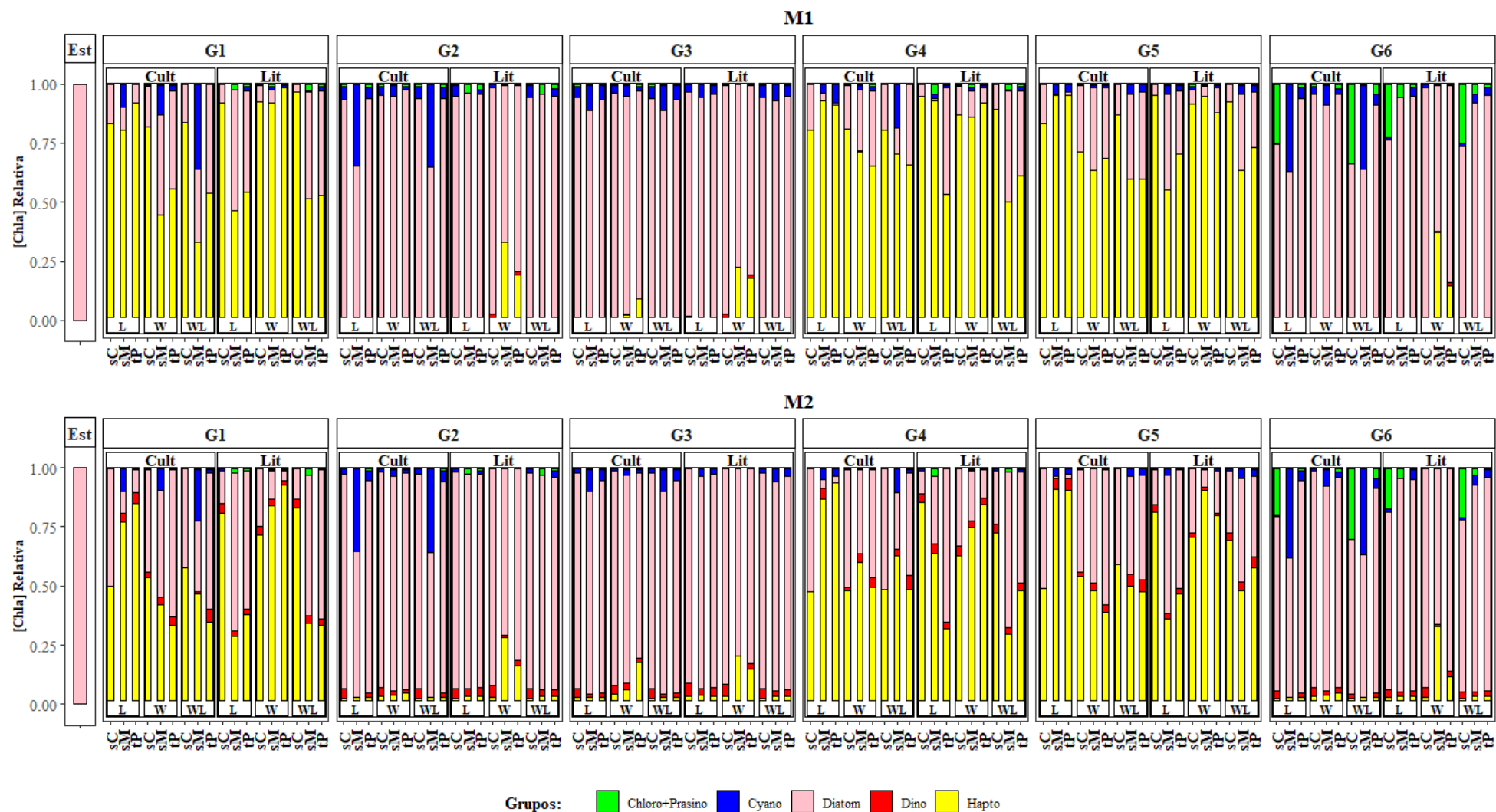


Figura A1 Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl *a* relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl *a* por grupo taxonômico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

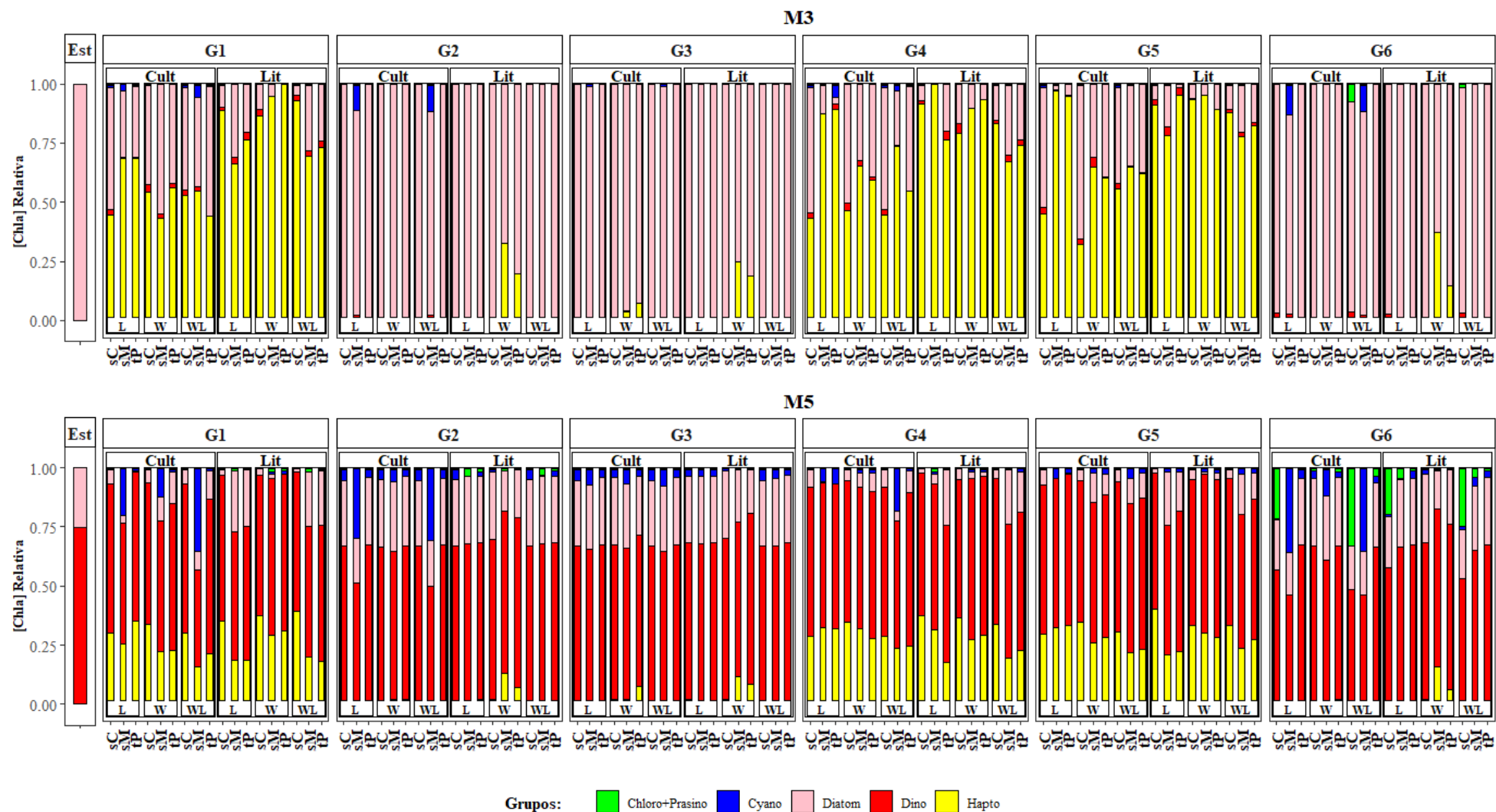


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

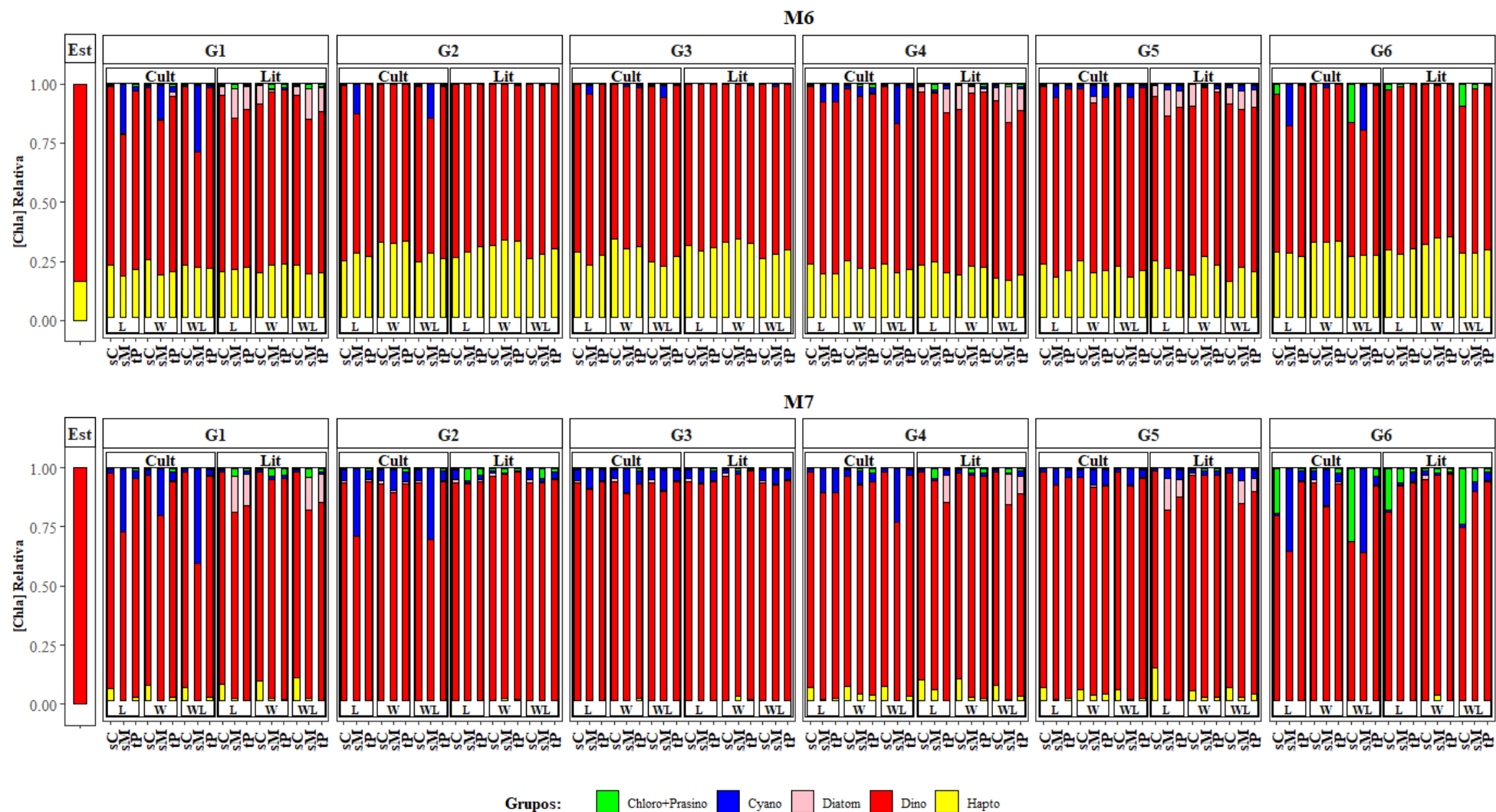


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

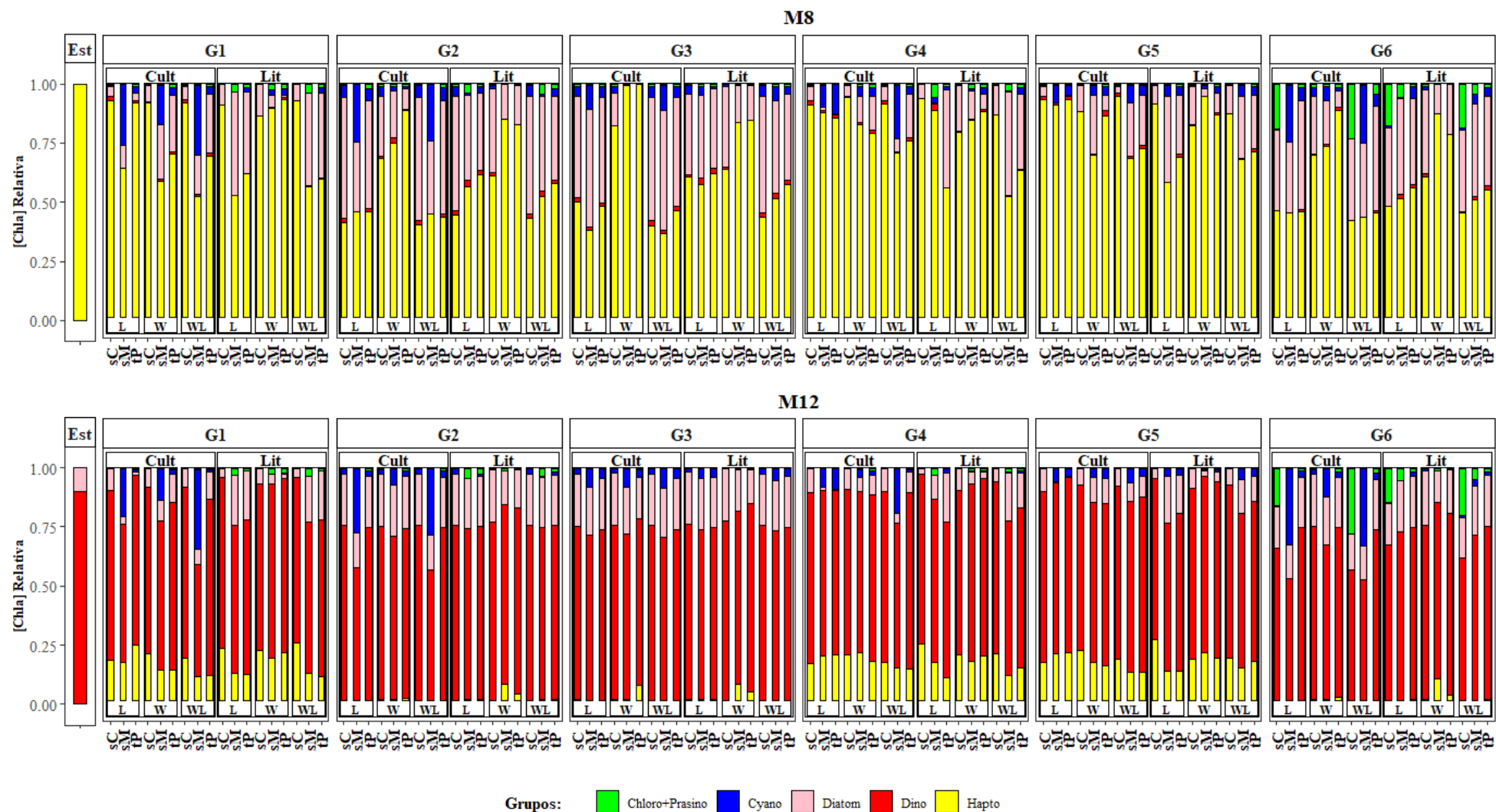


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

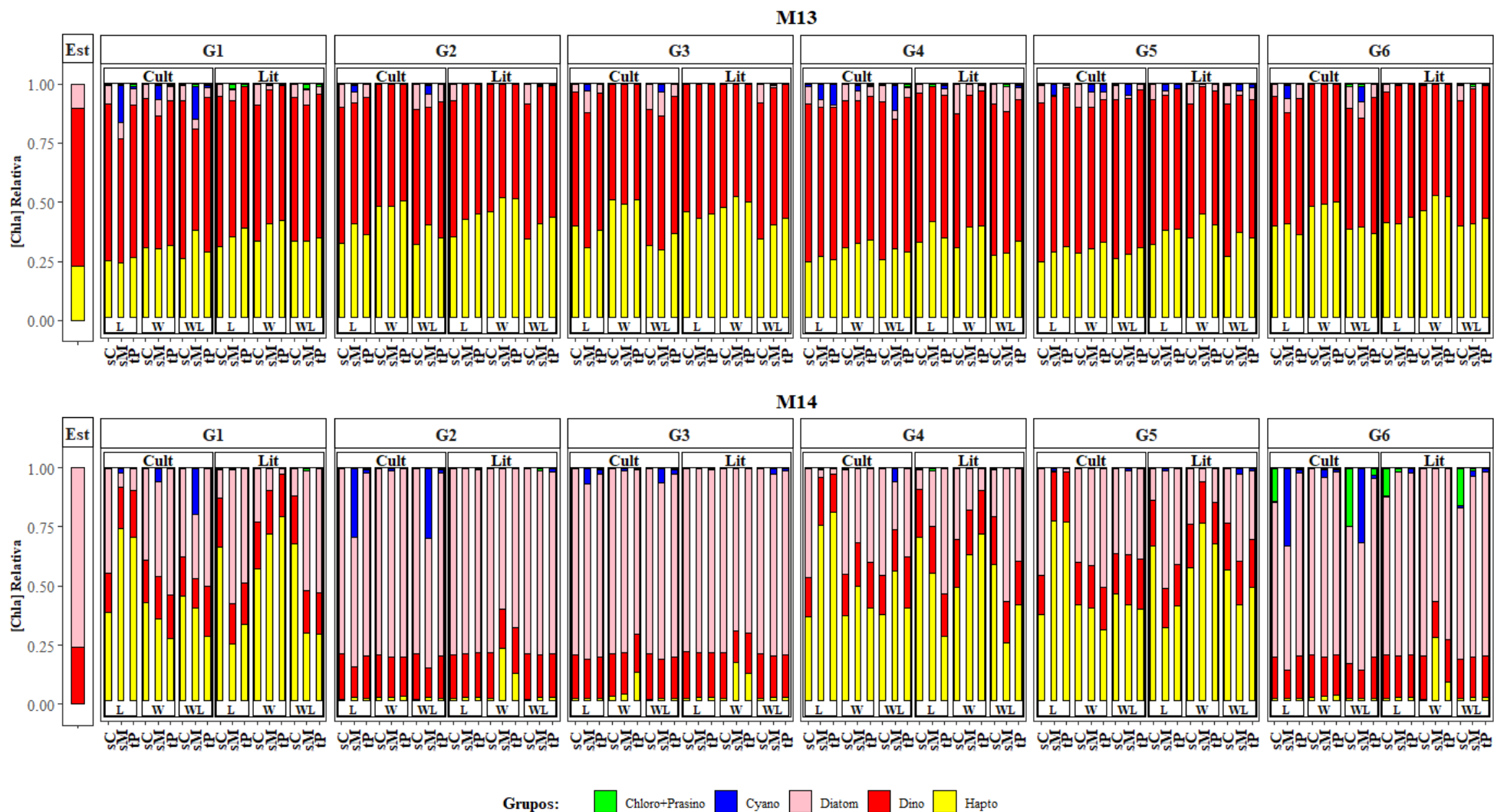


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

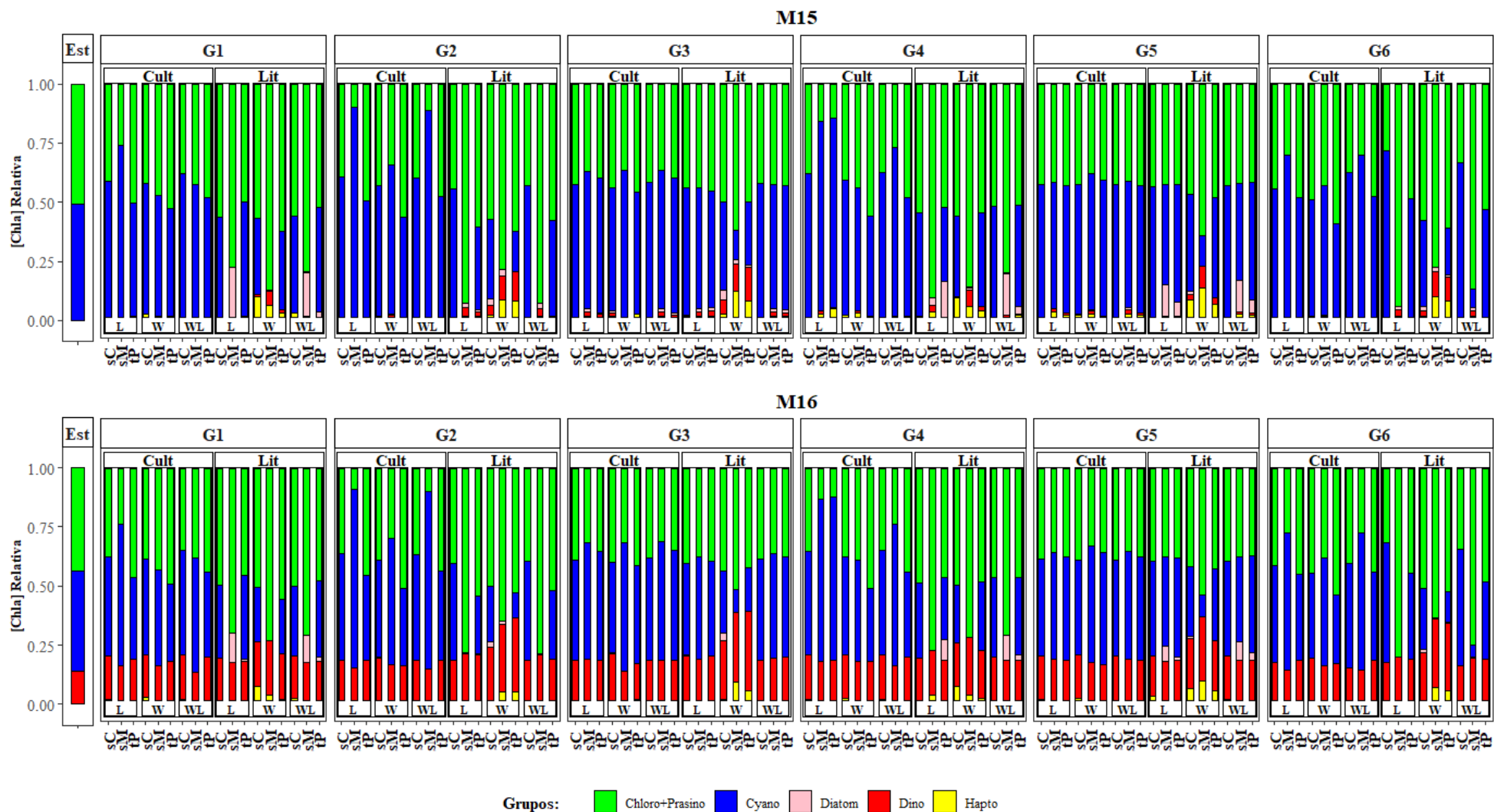


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.



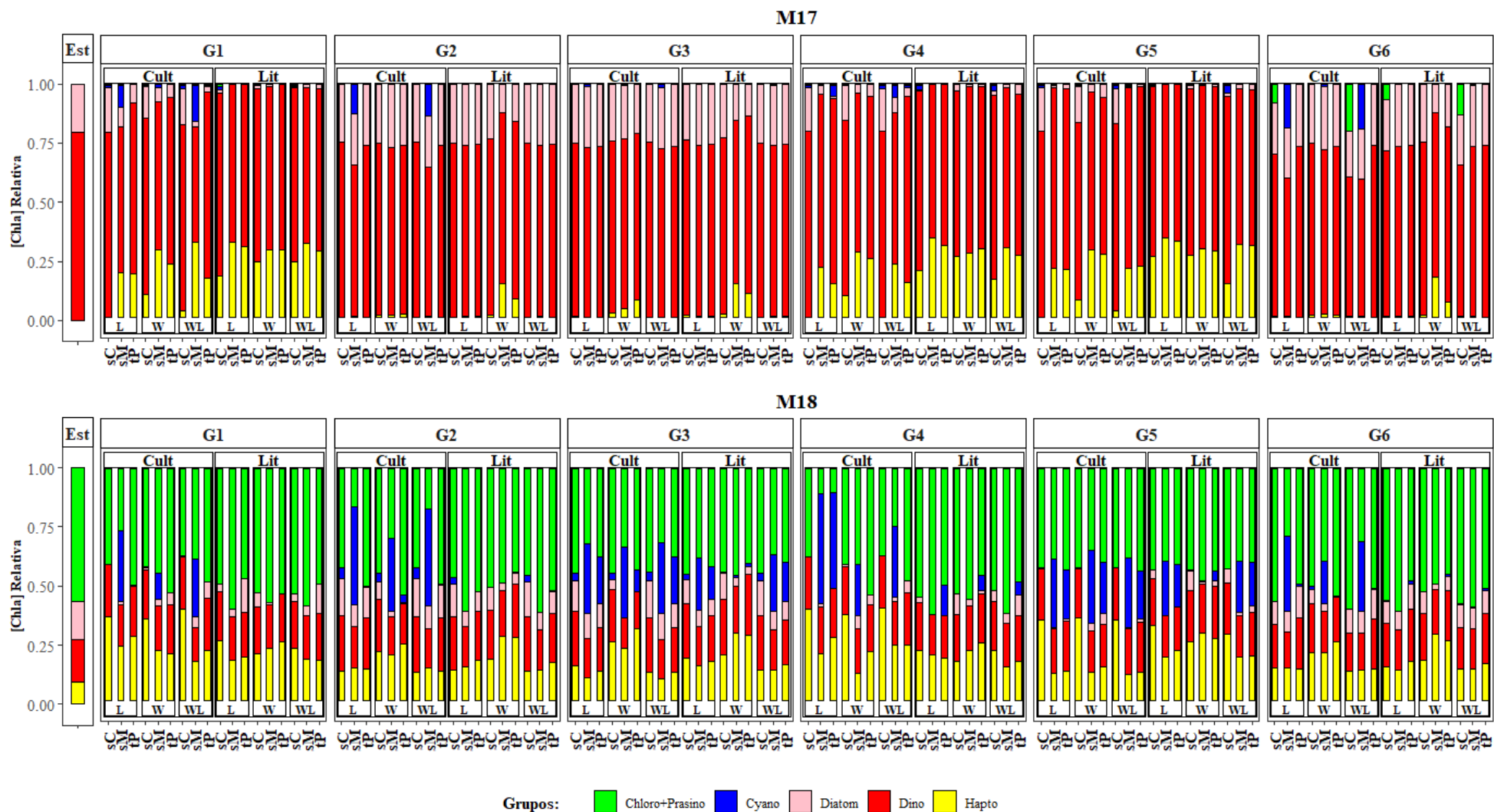


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

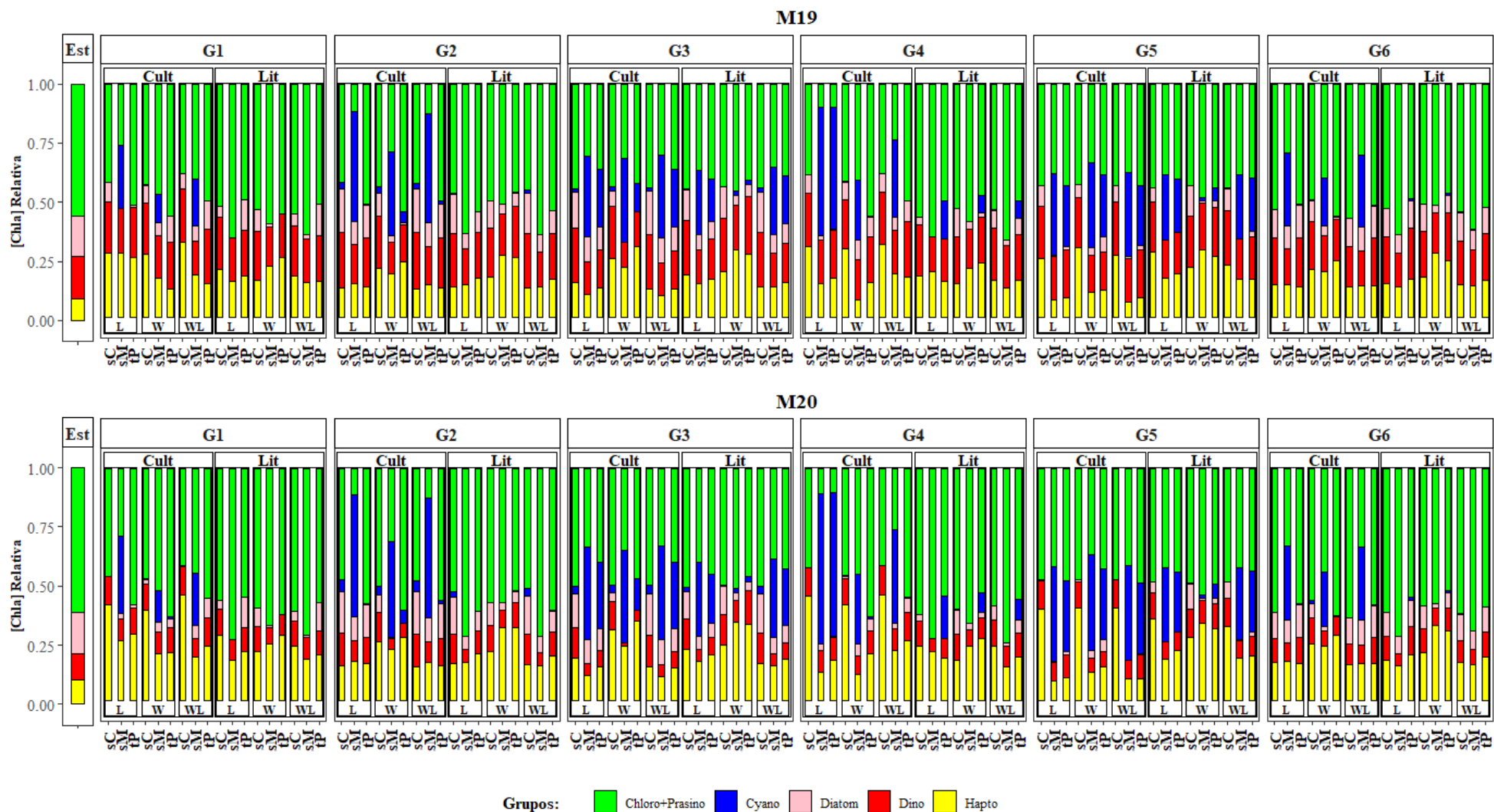


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

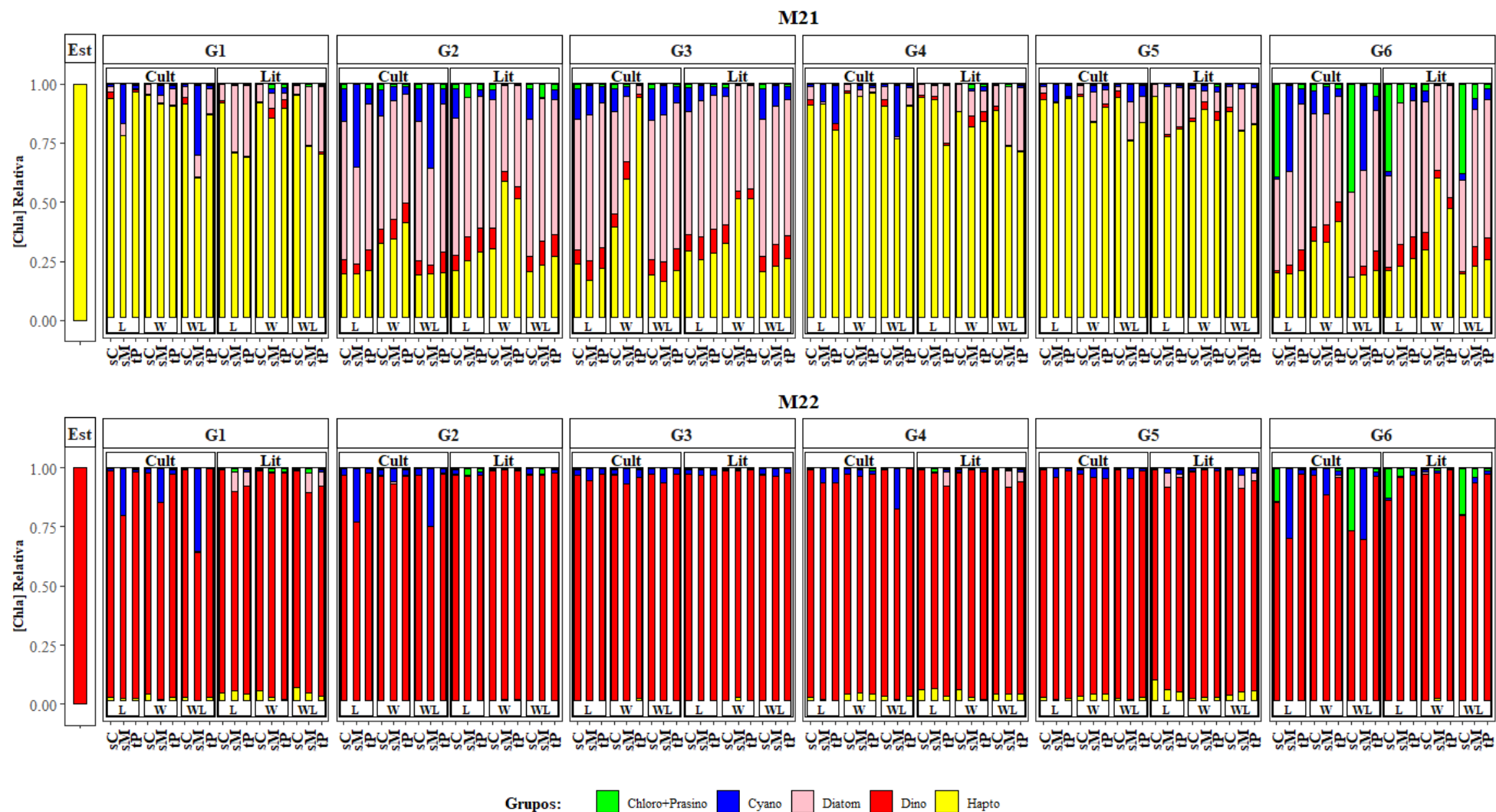


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

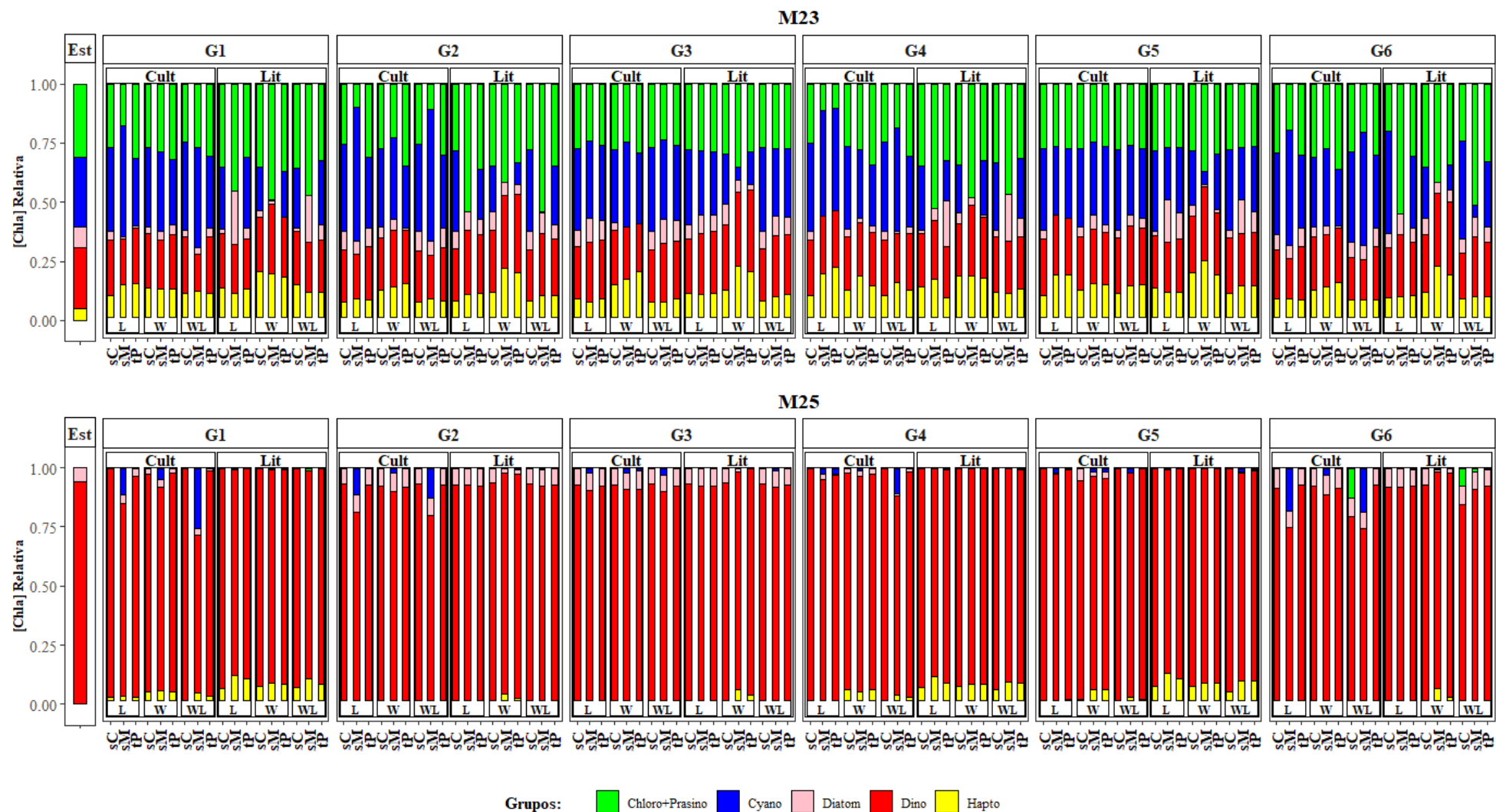


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

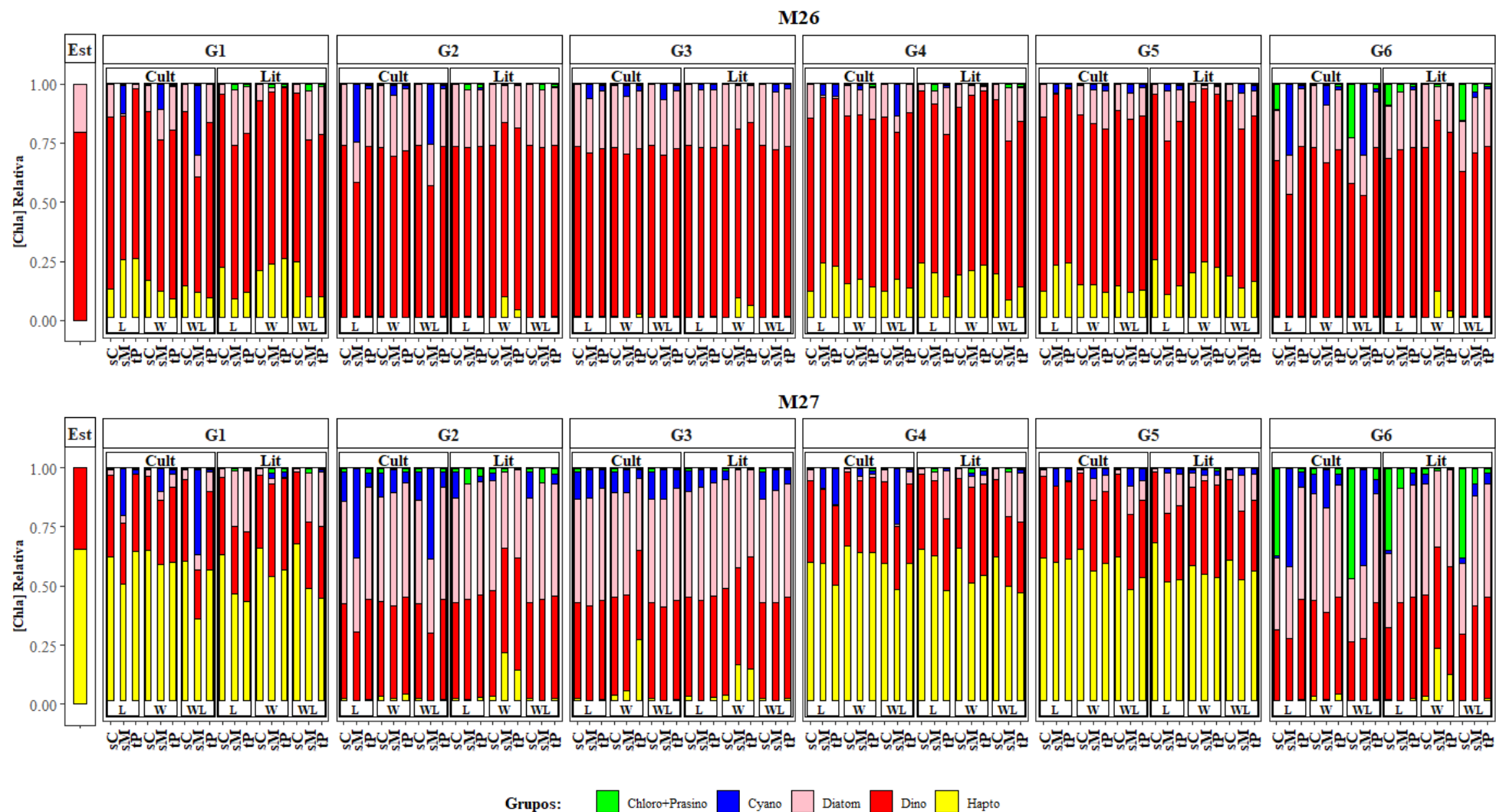


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

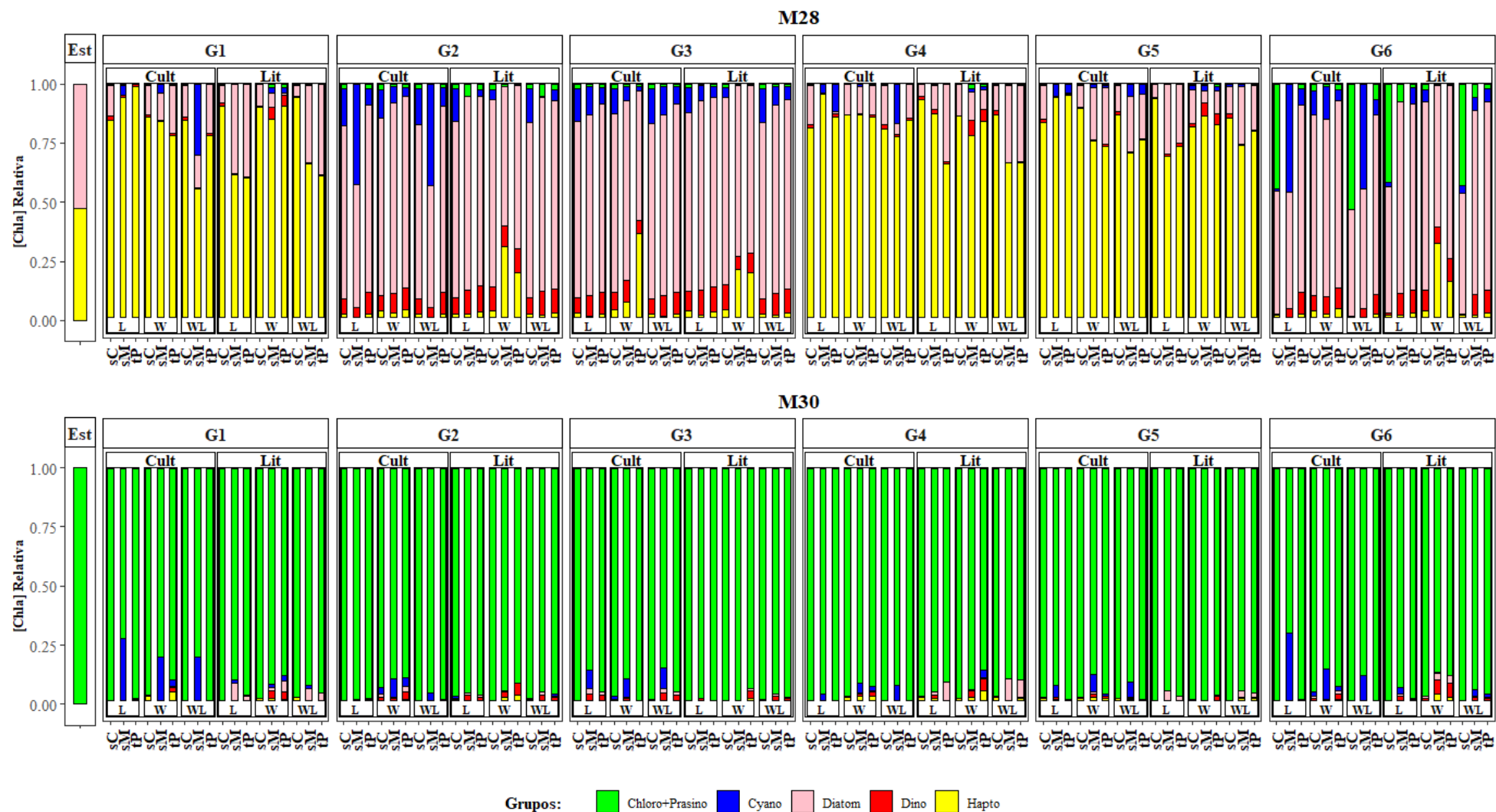


Figura A1Continuação Gráficos de barras dos resultados obtidos para cada um dos 108 testes efetuados para cada uma das 24 misturas. Cada conjunto de barras representa uma mistura e respectiva concentração de Chl a relativa a cada grupo obtida para cada teste. À esquerda de cada conjunto de gráficos apresenta-se o valor de referência estimado (Est) da concentração relativa de Chl a por grupo taxonómico, com o qual os restantes são comparados. As siglas referem-se aos diferentes parâmetros testados: variação de abordagem (W, WL, e L); variação de pigmentos (tP, sC e sM); variação de grupo (G1, G2, G3, G4, G5 e G6); variação na Origem de Rácios (Cult e Lit.). Ver texto para mais detalhes.

*Tabela A4 Diferenças relativas médias por teste, para cada grupo. Cada valor de diferença, é a média das diferenças entre o valor de concentração de Chl a obtido por CHEMTAX e o valor estimado das 24 misturas para cada teste.  $\bar{X}$  é média da diferença para cada teste e  $\sigma$  é o desvio padrão. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6. A tabela está organizada por ordem decrescente do valor médio seguido da ordem crescente do valor de desvio padrão*

Teste	Grup.	Rác.	Ab.	Pig.	Diatom	Hapto	Cyano	Dino	Chloro+Prasino	$\bar{X}$	$\sigma$
G1_Cult_L_sC	G1	Cult	L	sC	14.30%	17.67%	1.02%	3.61%	2.66%	7.85%	7.58%
G1_Cult_L_sM	G1	Cult	L	sM	21.41%	23.65%	17.87%	8.87%	7.41%	15.84%	7.35%
G1_Cult_L_tP	G1	Cult	L	tP	20.88%	23.18%	1.02%	3.50%	1.01%	9.92%	11.13%
G1_Cult_W_sC	G1	Cult	W	sC	15.75%	19.88%	0.99%	4.14%	2.60%	8.67%	8.54%
G1_Cult_W_sM	G1	Cult	W	sM	14.54%	15.93%	9.30%	7.13%	2.31%	9.84%	5.56%
G1_Cult_W_tP	G1	Cult	W	tP	13.29%	15.24%	1.57%	4.00%	1.36%	7.09%	6.67%
G1_Cult_WL_sC	G1	Cult	WL	sC	15.95%	19.68%	1.37%	3.72%	3.54%	8.85%	8.34%
G1_Cult_WL_sM	G1	Cult	WL	sM	17.50%	17.61%	24.34%	14.40%	3.71%	15.51%	7.53%
G1_Cult_WL_tP	G1	Cult	WL	tP	13.21%	14.58%	0.97%	2.96%	1.16%	6.57%	6.74%
G2_Cult_L_sC	G2	Cult	L	sC	9.37%	11.84%	4.42%	4.64%	3.05%	6.66%	3.75%
G2_Cult_L_sM	G2	Cult	L	sM	10.60%	12.55%	28.03%	9.69%	9.70%	14.11%	7.87%
G2_Cult_L_tP	G2	Cult	L	tP	10.23%	12.00%	2.37%	4.66%	1.26%	6.10%	4.78%
G2_Cult_W_sC	G2	Cult	W	sC	9.59%	12.48%	3.43%	5.30%	2.71%	6.70%	4.20%
G2_Cult_W_sM	G2	Cult	W	sM	10.83%	12.01%	8.99%	6.28%	5.70%	8.76%	2.76%
G2_Cult_W_tP	G2	Cult	W	tP	10.42%	11.91%	2.64%	5.62%	1.75%	6.46%	4.55%
G2_Cult_WL_sC	G2	Cult	WL	sC	9.43%	11.80%	4.32%	4.62%	2.96%	6.62%	3.79%
G2_Cult_WL_sM	G2	Cult	WL	sM	10.60%	12.51%	28.49%	10.24%	9.58%	14.28%	8.01%
G2_Cult_WL_tP	G2	Cult	WL	tP	10.12%	11.94%	2.68%	4.69%	1.38%	6.16%	4.64%
G3_Cult_L_sC	G3	Cult	L	sC	9.56%	12.17%	3.60%	4.78%	2.40%	6.50%	4.17%

*Tabela A4 Diferenças relativas médias por teste, para cada grupo. Cada valor de diferença, é a média das diferenças entre o valor de concentração de Chl a obtido por CHEMTAX e o valor estimado das 24 misturas para cada teste.  $\bar{X}$  é média da diferença para cada teste e  $\sigma$  é o desvio padrão. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6. A tabela está organizada por ordem decrescente do valor médio seguido da ordem crescente do valor de desvio padrão*

Teste	Grup.	Rác.	Ab.	Pig.	Diatom	Hapto	Cyano	Dino	Chloro+Prasino	$\bar{X}$	$\sigma$
G3_Cult_L_sM	G3	Cult	L	sM	10.75%	11.65%	10.50%	5.58%	5.28%	8.75%	3.07%
G3_Cult_L_tP	G3	Cult	L	tP	10.83%	11.90%	6.04%	4.83%	3.89%	7.50%	3.63%
G3_Cult_W_sC	G3	Cult	W	sC	9.42%	12.50%	2.66%	5.38%	2.39%	6.47%	4.40%
G3_Cult_W_sM	G3	Cult	W	sM	8.74%	10.37%	8.96%	6.44%	4.94%	7.89%	2.17%
G3_Cult_W_tP	G3	Cult	W	tP	6.86%	10.30%	2.85%	5.52%	2.29%	5.56%	3.25%
G3_Cult_WL_sC	G3	Cult	WL	sC	9.49%	11.77%	3.83%	4.58%	2.56%	6.45%	3.97%
G3_Cult_WL_sM	G3	Cult	WL	sM	10.74%	11.60%	10.96%	5.83%	5.42%	8.91%	3.02%
G3_Cult_WL_tP	G3	Cult	WL	tP	10.80%	11.84%	6.05%	4.78%	3.89%	7.47%	3.61%
G4_Cult_L_sC	G4	Cult	L	sC	14.06%	17.72%	1.32%	3.72%	3.42%	8.05%	7.33%
G4_Cult_L_sM	G4	Cult	L	sM	22.63%	23.12%	13.95%	4.12%	9.70%	14.70%	8.24%
G4_Cult_L_tP	G4	Cult	L	tP	23.59%	24.56%	15.09%	4.10%	9.71%	15.41%	8.82%
G4_Cult_W_sC	G4	Cult	W	sC	14.54%	19.02%	1.08%	4.25%	2.85%	8.35%	7.94%
G4_Cult_W_sM	G4	Cult	W	sM	16.86%	18.78%	5.10%	4.85%	3.03%	9.72%	7.47%
G4_Cult_W_tP	G4	Cult	W	tP	15.25%	17.66%	1.86%	4.34%	1.64%	8.15%	7.70%
G4_Cult_WL_sC	G4	Cult	WL	sC	14.27%	18.01%	1.38%	3.74%	3.54%	8.19%	7.44%
G4_Cult_WL_sM	G4	Cult	WL	sM	19.39%	20.70%	17.69%	7.81%	6.82%	14.48%	6.64%
G4_Cult_WL_tP	G4	Cult	WL	tP	15.56%	17.05%	0.95%	2.98%	1.19%	7.55%	8.05%
G5_Cult_L_sC	G5	Cult	L	sC	14.20%	17.33%	0.91%	3.70%	2.41%	7.71%	7.50%
G5_Cult_L_sM	G5	Cult	L	sM	23.87%	23.09%	7.99%	3.36%	3.50%	12.36%	10.32%
G5_Cult_L_tP	G5	Cult	L	tP	23.48%	23.11%	5.05%	3.08%	2.38%	11.42%	10.89%
G5_Cult_W_sC	G5	Cult	W	sC	14.29%	18.31%	1.00%	4.03%	2.48%	8.02%	7.77%
G5_Cult_W_sM	G5	Cult	W	sM	16.24%	17.64%	7.41%	5.26%	4.60%	10.23%	6.23%
G5_Cult_W_tP	G5	Cult	W	tP	13.84%	15.79%	5.82%	4.96%	3.36%	8.75%	5.65%



*Tabela A4 Diferenças relativas médias por teste, para cada grupo. Cada valor de diferença, é a média das diferenças entre o valor de concentração de Chl a obtido por CHEMTAX e o valor estimado das 24 misturas para cada teste.  $\bar{X}$  é média da diferença para cada teste e  $\sigma$  é o desvio padrão. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6. A tabela está organizada por ordem decrescente do valor médio seguido da ordem crescente do valor de desvio padrão*

Teste	Grup.	Rác.	Ab.	Pig.	Diatom	Hapto	Cyano	Dino	Chloro+Prasino	$\bar{X}$	$\sigma$
G5_Cult_WL_sC	G5	Cult	WL	sC	16.23%	19.11%	0.94%	3.62%	2.40%	8.46%	8.52%
G5_Cult_WL_sM	G5	Cult	WL	sM	17.54%	16.64%	8.17%	3.33%	3.67%	9.87%	6.87%
G5_Cult_WL_tP	G5	Cult	WL	tP	16.70%	16.26%	5.12%	3.10%	2.35%	8.71%	7.17%
G6_Cult_L_sC	G6	Cult	L	sC	8.71%	12.37%	0.84%	6.53%	12.82%	8.25%	4.90%
G6_Cult_L_sM	G6	Cult	L	sM	10.95%	12.53%	28.23%	12.20%	6.75%	14.13%	8.21%
G6_Cult_L_tP	G6	Cult	L	tP	10.19%	12.01%	2.59%	4.71%	1.34%	6.17%	4.70%
G6_Cult_W_sC	G6	Cult	W	sC	9.83%	12.37%	2.51%	5.10%	1.53%	6.27%	4.69%
G6_Cult_W_sM	G6	Cult	W	sM	10.08%	12.37%	9.16%	6.90%	3.50%	8.40%	3.37%
G6_Cult_W_tP	G6	Cult	W	tP	10.16%	12.05%	2.52%	5.57%	2.25%	6.51%	4.44%
G6_Cult_WL_sC	G6	Cult	WL	sC	9.78%	12.29%	1.08%	10.45%	20.26%	10.77%	6.84%
G6_Cult_WL_sM	G6	Cult	WL	sM	10.74%	12.43%	27.16%	12.40%	5.83%	13.71%	7.99%
G6_Cult_WL_tP	G6	Cult	WL	tP	9.93%	12.05%	2.38%	4.78%	2.51%	6.33%	4.42%
G1_Lit_L_sC	G1	Lit	L	sC	21.74%	23.64%	1.08%	3.49%	1.43%	10.28%	11.39%
G1_Lit_L_sM	G1	Lit	L	sM	19.45%	16.79%	5.11%	6.94%	5.38%	10.73%	6.85%
G1_Lit_L_tP	G1	Lit	L	tP	16.83%	18.49%	0.65%	5.92%	1.50%	8.68%	8.46%
G1_Lit_W_sC	G1	Lit	W	sC	20.16%	23.61%	2.02%	4.57%	1.17%	10.31%	10.71%
G1_Lit_W_sM	G1	Lit	W	sM	22.62%	25.50%	5.65%	4.96%	5.20%	12.79%	10.35%
G1_Lit_W_tP	G1	Lit	W	tP	24.19%	26.89%	2.60%	4.26%	2.68%	12.12%	12.30%
G1_Lit_WL_sC	G1	Lit	WL	sC	22.08%	24.93%	1.11%	4.45%	0.97%	10.71%	11.81%
G1_Lit_WL_sM	G1	Lit	WL	sM	19.26%	17.30%	5.16%	6.65%	5.54%	10.78%	6.90%
G1_Lit_WL_tP	G1	Lit	WL	tP	16.13%	17.09%	1.02%	5.47%	1.52%	8.24%	7.83%
G2_Lit_L_sC	G2	Lit	L	sC	9.53%	11.92%	3.30%	4.63%	2.05%	6.28%	4.24%
G2_Lit_L_sM	G2	Lit	L	sM	10.99%	12.06%	5.14%	5.48%	7.27%	8.19%	3.18%

*Tabela A4 Diferenças relativas médias por teste, para cada grupo. Cada valor de diferença, é a média das diferenças entre o valor de concentração de Chl a obtido por CHEMTAX e o valor estimado das 24 misturas para cada teste.  $\bar{X}$  é média da diferença para cada teste e  $\sigma$  é o desvio padrão. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6. A tabela está organizada por ordem decrescente do valor médio seguido da ordem crescente do valor de desvio padrão*

Teste	Grup.	Rác.	Ab.	Pig.	Diatom	Hapto	Cyano	Dino	Chloro+Prasino	$\bar{X}$	$\sigma$
G2_Lit_L_tP	G2	Lit	L	tP	10.32%	12.21%	2.53%	5.27%	2.33%	6.53%	4.52%
G2_Lit_W_sC	G2	Lit	W	sC	10.00%	12.23%	2.47%	5.10%	1.70%	6.30%	4.64%
G2_Lit_W_sM	G2	Lit	W	sM	12.02%	17.14%	5.05%	5.86%	3.71%	8.76%	5.67%
G2_Lit_W_tP	G2	Lit	W	tP	10.58%	15.01%	3.56%	6.15%	2.79%	7.62%	5.13%
G2_Lit_WL_sC	G2	Lit	WL	sC	9.47%	11.88%	3.55%	4.61%	2.29%	6.36%	4.11%
G2_Lit_WL_sM	G2	Lit	WL	sM	11.10%	12.01%	5.17%	5.37%	7.34%	8.20%	3.20%
G2_Lit_WL_tP	G2	Lit	WL	tP	10.30%	12.20%	2.41%	4.89%	1.92%	6.34%	4.67%
G3_Lit_L_sC	G3	Lit	L	sC	9.48%	12.38%	2.59%	5.14%	2.10%	6.34%	4.47%
G3_Lit_L_sM	G3	Lit	L	sM	10.89%	12.09%	5.83%	5.28%	3.24%	7.46%	3.82%
G3_Lit_L_tP	G3	Lit	L	tP	10.55%	12.11%	4.06%	5.25%	2.57%	6.91%	4.18%
G3_Lit_W_sC	G3	Lit	W	sC	9.77%	12.52%	2.10%	5.68%	1.73%	6.36%	4.73%
G3_Lit_W_sM	G3	Lit	W	sM	11.38%	17.37%	4.21%	6.16%	2.41%	8.31%	6.08%
G3_Lit_W_tP	G3	Lit	W	tP	10.80%	15.12%	2.85%	6.38%	2.40%	7.51%	5.43%
G3_Lit_WL_sC	G3	Lit	WL	sC	9.43%	11.91%	3.73%	4.64%	2.47%	6.43%	4.04%
G3_Lit_WL_sM	G3	Lit	WL	sM	10.88%	12.00%	6.91%	5.23%	3.65%	7.73%	3.59%
G3_Lit_WL_tP	G3	Lit	WL	tP	10.67%	12.05%	4.63%	4.90%	3.09%	7.07%	4.01%
G4_Lit_L_sC	G4	Lit	L	sC	22.47%	24.35%	0.93%	3.91%	0.90%	10.51%	11.86%
G4_Lit_L_sM	G4	Lit	L	sM	21.04%	23.71%	5.32%	5.37%	6.70%	12.43%	9.15%
G4_Lit_L_tP	G4	Lit	L	tP	19.43%	17.19%	4.43%	5.62%	1.51%	9.64%	8.10%
G4_Lit_W_sC	G4	Lit	W	sC	18.76%	21.96%	1.86%	5.00%	1.01%	9.72%	9.89%
G4_Lit_W_sM	G4	Lit	W	sM	21.22%	23.89%	5.34%	4.77%	4.58%	11.96%	9.72%
G4_Lit_W_tP	G4	Lit	W	tP	22.59%	25.56%	2.79%	4.34%	2.50%	11.55%	11.50%
G4_Lit_WL_sC	G4	Lit	WL	sC	20.22%	21.62%	0.72%	3.45%	0.78%	9.36%	10.62%

*Tabela A4 Diferenças relativas médias por teste, para cada grupo. Cada valor de diferença, é a média das diferenças entre o valor de concentração de Chl a obtido por CHEMTAX e o valor estimado das 24 misturas para cada teste.  $\bar{X}$  é média da diferença para cada teste e  $\sigma$  é o desvio padrão. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6. A tabela está organizada por ordem decrescente do valor médio seguido da ordem crescente do valor de desvio padrão*

Teste	Grup.	Rác.	Ab.	Pig.	Diatom	Hapto	Cyano	Dino	Chloro+Prasino	$\bar{X}$	$\sigma$
G4_Lit_WL_sM	G4	Lit	WL	sM	18.79%	16.00%	5.11%	5.96%	5.43%	10.26%	6.60%
G4_Lit_WL_tP	G4	Lit	WL	tP	18.25%	19.16%	2.31%	5.26%	1.69%	9.33%	8.67%
G5_Lit_L_sC	G5	Lit	L	sC	21.75%	26.57%	0.74%	5.12%	2.13%	11.26%	12.00%
G5_Lit_L_sM	G5	Lit	L	sM	19.56%	18.49%	5.58%	7.11%	3.14%	10.78%	7.67%
G5_Lit_L_tP	G5	Lit	L	tP	19.85%	20.55%	4.05%	5.46%	2.85%	10.55%	8.86%
G5_Lit_W_sC	G5	Lit	W	sC	20.14%	24.26%	1.52%	4.37%	2.04%	10.47%	10.86%
G5_Lit_W_sM	G5	Lit	W	sM	23.09%	28.00%	4.58%	5.20%	2.42%	12.66%	11.94%
G5_Lit_W_tP	G5	Lit	W	tP	21.54%	25.36%	2.39%	4.38%	2.01%	11.14%	11.36%
G5_Lit_WL_sC	G5	Lit	WL	sC	20.02%	22.20%	1.03%	3.46%	2.20%	9.78%	10.40%
G5_Lit_WL_sM	G5	Lit	WL	sM	20.11%	19.67%	6.07%	6.30%	3.18%	11.07%	8.15%
G5_Lit_WL_tP	G5	Lit	WL	tP	19.94%	21.11%	4.28%	5.42%	3.14%	10.78%	8.95%
G6_Lit_L_sC	G6	Lit	L	sC	8.67%	12.44%	2.52%	6.17%	13.14%	8.59%	4.42%
G6_Lit_L_sM	G6	Lit	L	sM	11.09%	12.04%	5.24%	5.39%	8.32%	8.42%	3.14%
G6_Lit_L_tP	G6	Lit	L	tP	10.17%	12.31%	2.45%	5.13%	1.65%	6.34%	4.72%
G6_Lit_W_sC	G6	Lit	W	sC	10.33%	12.26%	2.41%	5.12%	1.77%	6.38%	4.71%
G6_Lit_W_sM	G6	Lit	W	sM	12.96%	18.64%	5.16%	6.45%	3.87%	9.41%	6.23%
G6_Lit_W_tP	G6	Lit	W	tP	10.14%	14.60%	3.35%	6.00%	2.82%	7.38%	4.97%
G6_Lit_WL_sC	G6	Lit	WL	sC	8.79%	12.37%	2.30%	8.34%	15.57%	9.47%	4.97%
G6_Lit_WL_sM	G6	Lit	WL	sM	10.67%	12.13%	6.32%	5.63%	6.97%	8.34%	2.88%
G6_Lit_WL_tP	G6	Lit	WL	tP	10.42%	12.22%	2.24%	4.98%	1.57%	6.29%	4.81%

*Tabela A5 Valores de Similaridade obtidos para cada teste por mistura. Estes valores foram obtidos através da Similaridade existente entre cada mistura e o valor estimado para a mesma. . Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g.. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).*

Teste	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M25	M26	M27	M28	M30
L_sC_G1_Cult	16.40	55.72	49.60	75.14	94.23	95.28	96.50	84.97	93.38	63.99	91.11	93.95	97.84	70.56	79.59	69.35	83.98	95.51	89.44	96.06	88.89	95.25	63.13	91.17
L_sM_G1_Cult	9.73	10.17	27.02	59.28	80.35	76.41	66.06	71.88	85.25	24.86	76.57	79.21	72.06	55.79	53.37	52.63	69.69	82.23	73.09	84.54	66.84	79.98	50.86	79.48
L_tP_G1_Cult	7.61	10.66	29.08	69.58	94.23	95.28	95.37	77.89	92.06	30.33	93.35	92.15	82.12	74.54	76.70	79.18	86.48	95.51	90.01	96.53	76.10	95.25	50.86	91.17
W_sC_G1_Cult	16.90	48.34	40.42	71.15	93.56	94.44	95.48	84.97	91.45	59.45	91.83	94.64	90.11	72.87	79.96	72.37	85.01	95.51	87.80	94.25	86.38	95.25	62.72	91.17
W_sM_G1_Cult	42.31	50.70	52.43	70.95	86.07	83.15	60.57	82.15	89.08	60.76	93.33	97.58	70.30	77.26	81.74	79.69	81.93	88.75	88.84	89.12	83.66	90.63	61.98	88.10
W_tP_G1_Cult	41.65	69.51	40.27	82.17	94.23	95.28	72.80	84.97	91.26	75.61	93.40	90.70	77.54	79.98	87.50	81.55	81.13	95.51	91.84	93.83	93.26	95.25	69.94	91.17
WL_sC_G1_Cult	15.79	46.97	41.33	75.28	94.23	95.28	95.24	84.97	91.92	56.56	87.79	91.05	94.21	66.43	73.60	64.71	81.87	95.51	86.40	96.07	86.55	95.25	63.42	91.17
WL_sM_G1_Cult	30.51	33.65	36.32	52.83	67.93	61.83	53.75	63.14	72.05	41.34	92.40	93.18	52.19	73.24	75.79	71.70	53.62	66.64	80.56	69.46	62.94	58.90	63.92	88.26
WL_tP_G1_Cult	45.92	64.06	52.54	82.58	94.23	95.28	71.70	84.97	89.61	74.60	93.63	94.11	81.22	81.88	88.77	86.47	77.69	95.51	93.35	95.99	91.58	91.96	69.95	91.17
L_sC_G1_Lit	7.47	15.38	8.90	69.81	94.23	95.28	94.59	80.78	90.32	34.35	93.66	88.31	79.75	77.55	80.30	81.75	82.03	95.51	88.03	92.55	78.38	95.25	57.92	91.17
L_sM_G1_Lit	51.02	74.51	29.30	82.61	84.34	84.05	54.35	81.94	88.24	77.25	54.16	56.48	68.31	77.91	75.39	76.42	62.83	89.73	65.67	86.57	89.59	78.64	85.94	91.17
L_tP_G1_Lit	43.01	65.74	19.37	85.26	87.29	88.00	64.00	84.66	85.17	69.07	93.53	93.22	70.29	88.20	89.56	91.84	61.48	93.44	91.40	88.49	92.32	76.19	87.62	91.17
W_sC_G1_Lit	7.13	27.57	9.79	67.41	92.20	93.90	89.43	84.36	92.59	44.48	84.42	80.27	76.43	80.93	85.97	85.95	82.33	95.51	80.91	91.91	81.66	95.07	59.24	91.17
W_sM_G1_Lit	5.46	13.48	4.94	71.10	94.00	95.28	92.83	81.63	84.34	29.14	54.16	56.48	71.67	75.38	77.18	75.66	76.53	95.51	63.00	89.97	76.45	89.09	56.36	91.17
W_tP_G1_Lit	0.00	4.43	0.00	69.28	94.23	95.28	96.60	78.59	82.67	21.04	85.38	80.17	71.42	74.03	75.39	76.48	80.08	95.51	81.23	90.57	74.25	92.17	51.80	91.17
WL_sC_G1_Lit	3.17	14.36	4.30	65.62	92.42	92.51	96.31	80.72	90.91	33.13	92.17	87.49	76.12	77.54	81.11	81.95	85.29	95.51	86.44	92.21	78.18	95.05	55.18	91.17
WL_sM_G1_Lit	45.07	66.32	26.63	83.71	85.65	85.04	58.26	83.36	90.63	71.89	54.24	56.48	68.78	78.96	77.28	77.63	65.53	90.11	66.07	87.37	90.55	80.83	81.87	91.17
WL_tP_G1_Lit	44.25	70.62	22.97	86.64	88.70	89.59	61.30	84.97	88.47	73.41	91.81	89.75	72.21	88.20	89.90	90.28	62.67	94.65	92.37	90.53	93.17	78.50	86.54	91.17
L_sC_G2_Cult	92.31	90.14	94.48	92.85	94.23	95.28	41.97	84.97	92.93	93.47	89.17	92.33	96.08	85.84	85.72	87.11	16.64	95.51	90.88	97.29	93.26	33.96	58.14	91.17
L_sM_G2_Cult	63.87	68.71	83.18	74.88	78.69	74.24	46.72	74.26	81.30	71.29	61.23	63.79	86.17	52.94	47.85	41.91	16.85	80.26	69.59	85.72	80.21	31.18	49.03	91.17
L_tP_G2_Cult	92.69	90.14	94.48	92.85	93.43	95.28	46.91	84.97	89.38	91.93	93.80	93.99	94.74	88.20	90.54	92.55	18.03	95.51	96.35	96.91	93.26	33.80	58.10	91.17

*Tabela A5 Valores de Similaridade obtidos para cada teste por mistura. Estes valores foram obtidos através da Similaridade existente entre cada mistura e o valor estimado para a mesma. . Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g.. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).*

Teste	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M25	M26	M27	M28	M30
W_sC_G2_Cult	93.95	90.14	94.48	92.85	87.21	95.28	70.70	84.97	76.96	92.58	92.63	95.26	95.10	82.32	83.74	81.73	28.55	95.51	89.57	96.72	93.26	34.98	59.30	91.17
W_sM_G2_Cult	93.46	90.14	94.48	92.14	87.66	93.71	77.52	84.97	76.60	91.16	84.20	85.37	92.71	60.64	57.75	48.54	29.91	95.51	86.24	94.06	93.03	34.23	58.57	91.17
W_tP_G2_Cult	95.93	90.14	94.48	92.85	86.67	95.28	91.72	84.97	74.25	90.90	93.80	90.66	93.53	74.44	76.38	73.53	36.46	95.51	86.28	96.22	93.26	35.96	59.97	91.17
WL_sC_G2_Cult	92.42	90.14	94.48	92.85	94.23	95.28	40.99	84.97	93.00	93.44	89.55	92.67	96.08	86.24	86.11	87.54	16.25	95.51	91.32	97.30	93.26	33.94	58.11	91.17
WL_sM_G2_Cult	63.56	68.43	82.83	73.78	77.24	72.78	45.91	73.00	81.20	70.90	62.35	64.95	84.92	54.12	49.36	43.47	16.58	78.68	69.90	84.18	79.02	30.60	48.82	91.17
WL_tP_G2_Cult	92.38	90.14	94.48	92.85	93.91	95.28	44.51	84.97	91.27	91.99	93.80	95.72	94.80	88.20	90.70	93.66	17.09	95.51	96.43	96.91	93.26	33.74	58.02	91.17
L_sC_G2_Lit	93.30	90.14	94.48	92.85	93.95	95.28	45.43	84.97	90.56	93.17	93.80	96.56	95.85	88.20	90.70	92.71	18.10	95.51	93.49	97.16	93.26	34.08	58.28	91.17
L_sM_G2_Lit	94.69	90.14	94.48	92.85	91.50	95.28	58.04	84.97	82.71	92.71	54.16	56.48	94.74	81.55	82.67	78.96	21.89	95.51	69.48	96.87	93.26	33.42	57.90	91.17
L_tP_G2_Lit	94.47	90.14	94.48	92.85	89.33	95.28	63.42	84.97	80.10	93.28	87.56	82.09	95.05	83.32	85.11	85.95	24.90	95.51	89.07	96.74	93.26	34.67	58.95	91.17
W_sC_G2_Lit	87.01	90.14	85.63	92.85	88.68	95.28	75.33	84.97	77.39	94.34	80.44	76.65	96.93	81.88	84.96	84.65	36.21	95.51	82.90	97.83	93.26	40.60	66.81	91.17
W_sM_G2_Lit	66.11	78.60	64.58	88.22	86.21	95.28	88.07	84.97	72.72	79.58	54.23	56.48	86.01	77.84	80.07	78.04	52.17	95.51	66.64	94.70	90.97	54.76	83.68	91.17
W_tP_G2_Lit	78.90	90.10	76.97	91.66	86.22	95.28	85.85	84.97	73.51	91.00	70.48	67.65	92.73	79.16	81.22	80.65	45.47	95.51	74.81	96.50	93.26	46.79	74.38	91.17
WL_sC_G2_Lit	93.09	90.14	94.48	92.85	94.23	95.28	43.92	84.97	91.77	93.25	92.66	95.45	95.93	88.20	89.48	91.26	17.48	95.51	92.91	97.22	93.26	34.03	58.22	91.17
WL_sM_G2_Lit	94.55	90.14	94.48	92.85	91.98	95.28	53.66	84.97	84.50	92.31	54.41	56.52	94.58	82.75	83.76	80.06	20.21	95.51	70.17	96.51	93.26	33.36	57.79	91.17
WL_tP_G2_Lit	93.54	90.14	94.48	92.85	90.02	95.28	59.53	84.97	81.55	92.71	92.91	86.44	95.17	84.46	86.24	87.42	23.24	95.51	91.30	97.12	93.26	34.32	58.66	91.17
L_sC_G3_Cult	93.18	90.14	94.48	92.85	91.65	95.28	51.30	84.97	85.71	93.04	92.10	95.02	95.64	88.20	88.67	89.12	20.46	95.51	91.56	97.04	93.26	34.24	58.46	91.17
L_sM_G3_Cult	87.40	90.14	93.59	92.85	92.99	95.26	38.80	84.97	92.68	90.91	86.96	87.63	94.12	72.53	69.19	61.83	14.33	95.51	92.86	94.90	93.26	33.02	57.38	91.17
L_tP_G3_Cult	92.14	90.14	94.48	92.85	92.99	95.28	49.14	84.97	87.72	91.69	89.72	91.13	94.52	77.93	75.52	69.78	18.69	95.51	94.52	96.76	93.26	33.82	58.10	91.17
W_sC_G3_Cult	94.80	90.14	94.48	92.85	85.79	95.28	85.07	84.97	73.94	92.54	91.34	94.64	95.11	78.61	80.15	77.61	34.71	95.51	89.71	96.90	93.26	35.71	60.03	91.17
W_sM_G3_Cult	92.03	90.14	91.88	92.85	89.13	93.43	96.60	84.97	75.63	91.72	86.70	87.05	94.09	60.81	55.25	47.99	52.96	95.51	81.73	95.23	93.26	37.51	62.81	91.17
W_tP_G3_Cult	87.74	87.63	88.55	92.85	87.64	95.28	96.60	84.97	73.87	89.69	92.65	97.49	92.25	72.74	71.19	64.82	84.38	95.51	84.96	95.29	93.26	60.64	85.16	91.17
WL_sC_G3_Cult	92.79	90.14	94.48	92.85	94.23	95.28	40.74	84.97	93.08	93.35	91.44	94.37	96.04	88.20	88.15	89.81	16.19	95.51	92.66	97.30	93.26	33.95	58.12	91.17
WL_sM_G3_Cult	87.59	90.14	93.87	92.45	92.55	94.35	37.44	84.97	92.10	90.80	86.48	87.18	93.48	72.43	68.93	61.67	13.83	95.51	92.45	94.09	93.24	33.01	57.37	91.17
WL_tP_G3_Cult	92.03	90.14	94.48	92.85	93.61	95.28	47.29	84.97	89.20	91.84	89.64	91.08	94.60	78.48	76.02	70.45	17.98	95.51	94.49	96.76	93.26	33.78	58.06	91.17
L_sC_G3_Lit	94.61	90.14	94.48	92.85	88.59	95.28	62.33	84.97	79.41	93.90	93.10	96.02	96.17	85.73	87.72	86.37	25.44	95.51	92.47	97.23	93.26	34.89	59.22	91.17

*Tabela A5 Valores de Similaridade obtidos para cada teste por mistura. Estes valores foram obtidos através da Similaridade existente entre cada mistura e o valor estimado para a mesma. . Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g.. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).*

Teste	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M25	M26	M27	M28	M30
L_sM_G3_Lit	93.19	90.14	94.48	92.85	91.00	95.28	59.14	84.97	82.02	92.88	90.47	93.87	94.69	74.62	71.61	63.73	22.10	95.51	94.81	96.75	93.26	33.34	57.84	91.17
L_tP_G3_Lit	94.22	90.14	94.48	92.85	89.54	95.28	63.83	84.97	80.34	93.19	89.91	95.84	95.03	79.12	77.07	72.13	24.68	95.51	94.32	96.72	93.26	34.50	58.81	91.17
W_sC_G3_Lit	96.45	90.14	94.48	92.85	87.12	95.28	65.96	84.97	77.30	93.98	83.02	83.83	96.65	86.44	87.29	86.49	28.17	95.51	91.05	97.90	93.26	35.63	59.87	91.17
W_sM_G3_Lit	77.27	88.76	72.10	92.85	85.58	95.28	86.65	84.97	72.57	85.95	66.30	66.47	86.25	78.10	79.12	77.31	45.67	95.51	71.76	93.09	93.26	49.30	75.80	91.17
W_tP_G3_Lit	80.07	90.14	77.89	89.61	87.49	95.28	87.49	84.97	74.62	91.15	72.95	75.63	90.38	73.79	74.80	73.68	45.63	95.51	75.98	95.33	90.87	47.55	74.40	91.17
WL_sC_G3_Lit	92.99	90.14	94.48	92.85	94.23	95.28	44.32	84.97	91.46	93.28	91.73	94.64	95.95	88.20	88.35	90.03	17.63	95.51	92.29	97.22	93.26	34.04	58.23	91.17
WL_sM_G3_Lit	91.47	90.14	94.48	92.85	91.92	95.28	52.79	84.97	84.72	92.05	90.23	92.44	94.49	74.38	71.47	63.71	19.67	95.51	95.79	96.22	93.26	33.21	57.66	91.17
WL_tP_G3_Lit	93.46	90.14	94.48	92.85	90.54	95.28	59.06	84.97	82.00	92.67	90.93	93.84	94.96	78.16	76.01	70.63	22.73	95.51	95.40	96.88	93.26	34.21	58.53	91.17
L_sC_G4_Cult	19.23	58.26	50.66	76.73	94.23	95.28	94.51	84.97	93.08	65.94	88.05	91.12	97.51	66.74	75.74	65.29	81.21	95.51	87.70	96.06	89.49	95.25	66.37	91.17
L_sM_G4_Cult	2.89	4.13	11.49	67.39	93.94	93.21	91.12	77.86	88.43	24.77	66.63	68.30	79.05	37.65	37.28	33.46	81.61	95.51	70.59	94.95	75.20	95.09	50.86	91.17
L_tP_G4_Cult	0.85	2.94	2.88	67.03	93.83	92.64	88.68	77.22	85.78	19.40	65.50	67.56	79.96	35.94	35.93	31.91	71.93	95.51	69.12	95.41	75.12	85.39	51.51	91.17
W_sC_G4_Cult	18.32	55.35	47.92	70.17	93.89	94.46	96.60	84.97	92.24	65.15	90.68	93.58	90.89	70.81	78.31	70.02	86.10	95.51	87.87	93.19	88.32	95.25	62.65	91.17
W_sM_G4_Cult	25.92	39.63	30.83	71.62	93.71	94.28	85.68	83.69	89.29	52.36	91.39	95.29	72.30	76.49	78.30	72.11	84.60	95.51	87.86	93.04	85.73	94.58	61.53	91.17
W_tP_G4_Cult	31.76	50.90	37.41	76.12	94.23	95.28	81.94	84.97	89.62	61.72	93.34	88.41	75.27	78.58	84.73	82.85	86.03	95.51	88.04	93.04	88.50	95.25	62.52	91.17
WL_sC_G4_Cult	19.12	57.20	49.40	76.76	94.23	95.28	94.61	84.97	92.47	64.97	87.60	90.70	97.21	66.19	74.99	64.66	80.86	95.51	87.26	96.06	89.19	94.86	66.56	91.17
WL_sM_G4_Cult	11.23	26.55	22.09	62.73	83.34	80.30	72.97	76.64	84.45	39.87	77.58	79.30	72.26	53.57	56.64	49.53	68.40	85.73	75.28	84.71	75.34	78.84	55.16	91.17
WL_tP_G4_Cult	33.93	48.24	42.50	79.10	94.23	95.28	78.58	84.97	89.74	61.97	93.58	94.21	82.53	79.77	85.31	84.07	80.89	95.51	92.76	96.54	87.18	94.96	63.99	91.17
L_sC_G4_Lit	5.14	10.74	6.20	67.61	94.23	93.65	96.60	79.51	88.89	30.30	93.56	89.35	78.36	76.41	78.80	80.44	84.36	95.51	87.98	92.09	77.17	95.25	55.63	91.17
L_sM_G4_Lit	0.88	32.06	0.00	72.17	92.54	94.06	92.15	84.97	82.95	45.39	54.16	56.48	66.15	74.03	75.39	72.95	83.32	95.51	66.30	87.49	80.06	95.25	60.43	91.17
L_tP_G4_Lit	45.14	72.35	18.84	86.41	88.14	89.21	57.35	84.97	88.10	74.55	79.19	84.13	69.89	74.03	75.39	75.53	65.89	94.66	84.13	89.71	93.26	82.26	81.31	91.17
W_sC_G4_Lit	11.88	36.78	15.92	68.28	90.77	92.66	82.44	84.97	92.19	52.52	85.42	82.09	74.15	83.69	88.84	88.98	78.85	95.51	83.60	91.83	84.45	93.88	63.26	91.17
W_sM_G4_Lit	10.72	23.93	9.79	72.65	94.10	95.28	87.70	82.50	86.08	38.29	54.57	56.61	73.16	77.13	79.07	77.57	72.93	95.51	64.64	90.78	78.59	86.16	62.28	91.17
W_tP_G4_Lit	6.42	13.13	6.16	71.15	94.23	95.28	91.48	79.61	85.64	29.26	89.30	86.93	71.01	75.95	77.86	77.92	75.27	95.51	85.81	91.02	76.60	89.47	58.60	91.17
WL_sC_G4_Lit	10.38	25.18	14.14	71.26	94.23	95.28	89.87	83.22	93.86	42.25	93.65	91.60	80.99	79.51	83.62	84.08	79.42	95.51	91.88	93.00	80.91	95.25	61.03	91.17
WL_sM_G4_Lit	46.90	73.88	28.46	85.25	87.32	87.55	53.65	84.85	95.00	77.21	54.31	56.58	70.74	79.01	77.85	77.57	65.64	92.60	66.80	89.89	91.84	83.19	81.50	91.17

*Tabela A5 Valores de Similaridade obtidos para cada teste por mistura. Estes valores foram obtidos através da Similaridade existente entre cada mistura e o valor estimado para a mesma. . Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g.. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).*

Teste	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M25	M26	M27	M28	M30
WL_tP_G4_Lit	36.12	52.46	22.63	82.71	90.26	90.89	65.09	84.97	90.63	60.46	89.44	90.70	73.96	83.80	82.86	83.95	63.46	95.23	92.09	90.24	89.74	80.75	81.44	91.17
L_sC_G5_Cult	16.51	56.68	48.87	75.86	94.23	95.28	96.60	84.97	92.97	64.79	92.24	94.90	97.46	72.24	81.90	71.27	83.42	95.51	90.22	96.06	89.13	95.25	64.08	91.17
L_sM_G5_Cult	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
L_tP_G5_Cult	1.34	1.74	4.31	69.62	94.23	95.28	96.60	77.07	86.29	23.55	92.14	93.81	80.03	74.41	73.85	72.92	83.89	95.51	86.58	96.80	74.78	95.25	51.14	91.17
W_sC_G5_Cult	22.51	46.40	54.11	63.71	88.56	87.76	85.50	83.90	93.48	56.92	83.49	89.61	83.69	70.41	75.93	68.17	77.63	91.43	86.27	88.19	84.44	94.69	62.13	97.68
W_sM_G5_Cult	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
W_tP_G5_Cult	30.08	63.70	37.39	75.05	94.23	93.91	89.64	84.97	88.88	71.33	90.44	91.98	73.28	74.07	74.21	67.76	80.68	95.51	87.47	91.75	91.46	94.56	73.36	91.17
WL_sC_G5_Cult	12.76	44.98	38.98	74.80	94.23	95.28	96.60	84.97	91.29	55.41	92.28	94.94	93.95	72.00	79.84	71.00	84.34	95.51	89.61	96.06	86.16	95.25	60.97	91.17
WL_sM_G5_Cult	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
WL_tP_G5_Cult	36.49	49.35	35.85	80.40	94.23	95.28	75.09	84.97	87.22	62.29	92.05	93.82	78.79	74.94	74.47	72.86	74.54	95.51	90.75	96.34	87.23	88.64	68.66	91.17
L_sC_G5_Lit	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
L_sM_G5_Lit	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
L_tP_G5_Lit	26.63	55.72	1.40	82.59	89.89	91.68	71.20	84.97	85.17	61.11	87.83	94.35	68.02	70.58	69.20	65.17	72.08	95.51	92.13	88.43	88.62	87.72	74.05	91.17
W_sC_G5_Lit	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
W_sM_G5_Lit	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
W_tP_G5_Lit	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
WL_sC_G5_Lit	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
WL_sM_G5_Lit	10.48	19.70	10.07	72.48	94.23	95.28	90.14	81.24	85.30	33.34	85.77	88.50	72.00	76.01	76.07	75.24	75.53	95.51	86.07	90.23	77.98	88.50	59.62	91.17
WL_tP_G5_Lit	23.40	38.18	15.34	76.69	90.31	90.95	73.55	84.97	90.01	51.36	86.77	93.17	69.78	72.63	70.87	66.66	73.77	94.56	92.05	89.02	85.89	90.51	68.46	91.17
L_sC_G6_Cult	73.31	82.14	92.57	83.33	87.06	83.80	47.23	84.00	85.80	86.98	93.80	97.58	90.89	84.92	88.95	89.15	17.13	89.21	91.59	95.74	90.45	32.08	49.28	91.17
L_sM_G6_Cult	61.57	66.00	81.35	68.69	73.02	67.46	46.40	68.51	78.20	67.59	80.37	83.18	80.50	66.81	67.36	63.86	16.75	72.86	77.38	79.18	74.06	28.36	46.75	77.10
L_tP_G6_Cult	92.61	90.14	94.48	92.85	93.24	95.28	46.78	84.97	89.46	91.90	93.80	94.69	94.72	88.20	90.70	92.74	17.99	95.51	95.95	96.87	93.26	33.80	58.10	91.17
W_sC_G6_Cult	94.57	90.14	94.48	92.85	87.15	95.28	72.06	84.97	76.65	92.30	93.18	93.56	94.92	80.84	84.84	84.11	29.07	95.51	92.25	96.72	93.26	34.94	59.25	91.17
W_sM_G6_Cult	89.62	90.14	94.44	88.22	86.06	87.49	75.77	84.97	75.75	90.90	92.86	94.41	92.03	72.66	72.83	65.64	28.91	92.56	88.38	92.81	90.02	33.88	58.25	91.17
W_tP_G6_Cult	94.24	90.14	94.48	92.85	86.68	95.28	92.16	84.97	74.67	91.52	92.03	86.77	93.51	74.26	76.47	75.33	36.61	95.51	84.70	95.75	93.26	36.02	60.10	91.17

*Tabela A5 Valores de Similaridade obtidos para cada teste por mistura. Estes valores foram obtidos através da Similaridade existente entre cada mistura e o valor estimado para a mesma. . Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, e.g.. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).*

Teste	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M12	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M25	M26	M27	M28	M30
<b>WL_sC_G6_Cult</b>	64.76	72.70	85.39	71.55	76.63	71.74	43.06	73.08	86.25	76.30	87.25	96.53	80.14	85.32	89.07	88.44	15.34	76.62	88.92	83.92	80.34	26.69	42.79	91.17
<b>WL_sM_G6_Cult</b>	62.69	67.24	82.45	68.94	72.48	67.07	44.57	68.11	78.43	68.69	80.63	82.93	79.99	70.15	68.79	64.88	16.09	72.43	78.77	78.51	74.05	28.24	47.76	91.17
<b>WL_tP_G6_Cult</b>	89.84	90.14	94.48	92.85	92.98	95.28	46.64	84.97	89.15	91.69	93.79	95.10	94.94	88.20	90.19	92.25	17.88	95.51	95.89	96.81	93.26	33.73	57.99	91.17
<b>L_sC_G6_Lit</b>	75.02	84.07	93.01	84.89	88.05	84.99	49.38	84.97	84.22	89.11	78.84	87.50	91.98	84.44	88.51	88.59	18.01	90.44	82.42	95.92	91.59	32.92	50.60	91.17
<b>L_sM_G6_Lit</b>	93.03	90.14	94.48	92.85	91.66	95.28	52.51	84.97	84.53	91.83	54.16	56.48	94.17	83.19	84.01	80.41	19.65	95.51	70.03	96.23	93.26	33.20	57.67	91.17
<b>L_tP_G6_Lit</b>	93.38	90.14	94.48	92.85	90.04	95.28	57.74	84.97	81.70	92.27	93.80	94.02	94.77	85.95	88.10	89.64	22.51	95.51	94.66	96.46	93.26	34.24	58.49	91.17
<b>W_sC_G6_Lit</b>	97.05	90.14	94.48	92.85	88.02	95.28	62.59	84.97	78.99	92.56	88.92	83.43	95.25	84.33	88.11	88.07	26.03	95.51	89.92	96.87	93.26	35.06	59.23	91.17
<b>W_sM_G6_Lit</b>	61.88	73.37	59.92	86.67	84.98	95.28	90.44	84.97	71.80	74.74	54.16	56.48	83.49	76.52	79.18	76.55	53.29	95.51	65.69	92.19	89.80	56.54	85.28	91.17
<b>W_tP_G6_Lit</b>	83.25	90.14	81.60	92.85	84.64	95.28	81.14	84.97	72.41	92.31	73.25	70.30	94.17	80.98	83.58	82.19	41.73	95.51	77.39	96.54	93.26	44.77	71.12	91.17
<b>WL_sC_G6_Lit</b>	72.35	81.05	91.34	79.02	82.33	78.33	46.57	79.03	85.05	84.74	83.56	90.27	86.24	85.12	89.13	88.90	16.83	83.35	85.22	88.88	85.72	30.06	48.65	91.17
<b>WL_sM_G6_Lit</b>	90.80	90.14	94.42	92.55	90.42	93.99	52.11	84.97	83.74	91.48	61.46	62.12	94.08	83.49	84.60	82.07	19.46	95.51	75.06	95.28	93.26	33.15	57.59	91.17
<b>WL_tP_G6_Lit</b>	93.94	90.14	94.44	92.85	90.29	95.28	56.84	84.97	82.18	92.15	93.70	90.37	94.67	85.37	87.39	88.84	22.11	95.51	93.91	96.57	93.26	34.18	58.47	91.17



Tabela A6 Média ( $\bar{x}$ ), máximo (máx.), mínimo (mín.), e desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de Similaridade de Bray-Curtis entre misturas para cada teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).

Teste	$\bar{x}$	$\sigma$	Mín.	Máx.	varAb	varPig	varGrup	varRac
<i>L_sC_G1_Cult</i>	80.46	19.68	16.40	97.84	L	sC	G1	Cult
<i>L_sM_G1_Cult</i>	61.97	22.76	9.73	85.25	L	sM	G1	Cult
<i>L_tP_G1_Cult</i>	74.25	27.58	7.61	96.53	L	tP	G1	Cult
<i>W_sC_G1_Cult</i>	79.00	20.44	16.90	95.51	W	sC	G1	Cult
<i>W_sM_G1_Cult</i>	77.13	14.97	42.31	97.58	W	sM	G1	Cult
<i>W_tP_G1_Cult</i>	82.10	15.16	40.27	95.51	W	tP	G1	Cult
<i>WL_sC_G1_Cult</i>	77.98	20.94	15.79	96.07	WL	sC	G1	Cult
<i>WL_sM_G1_Cult</i>	63.17	17.11	30.51	93.18	WL	sM	G1	Cult
<i>WL_tP_G1_Cult</i>	82.87	13.71	45.92	95.99	WL	tP	G1	Cult
<i>L_sC_G1_Lit</i>	73.89	28.06	7.47	95.51	L	sC	G1	Lit
<i>L_sM_G1_Lit</i>	73.60	15.50	29.30	91.17	L	sM	G1	Lit
<i>L_tP_G1_Lit</i>	79.18	18.21	19.37	93.53	L	tP	G1	Lit
<i>W_sC_G1_Lit</i>	74.19	25.95	7.13	95.51	W	sC	G1	Lit
<i>W_sM_G1_Lit</i>	67.53	27.92	4.94	95.51	W	sM	G1	Lit
<i>W_tP_G1_Lit</i>	69.24	30.70	0.00	96.60	W	tP	G1	Lit
<i>WL_sC_G1_Lit</i>	72.87	29.10	3.17	96.31	WL	sC	G1	Lit
<i>WL_sM_G1_Lit</i>	73.48	16.32	26.63	91.17	WL	sM	G1	Lit
<i>WL_tP_G1_Lit</i>	80.11	17.46	22.97	94.65	WL	tP	G1	Lit
<i>L_sC_G2_Cult</i>	82.74	21.76	16.64	97.29	L	sC	G2	Cult
<i>L_sM_G2_Cult</i>	65.63	18.86	16.85	91.17	L	sM	G2	Cult

Tabela A6 Média ( $\bar{X}$ ), máximo (máx.), mínimo (mín.), e desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de Similaridade de Bray-Curtis entre misturas para cada teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).

Teste	$\bar{X}$	$\sigma$	Mín.	Máx.	varAb	varPig	varGrup	varRac
L_tP_G2_Cult	83.71	21.43	18.03	96.91	L	tP	G2	Cult
W_sC_G2_Cult	83.29	18.22	28.55	96.72	W	sC	G2	Cult
W_sM_G2_Cult	78.91	19.70	29.91	95.51	W	sM	G2	Cult
W_tP_G2_Cult	83.10	17.13	35.96	96.22	W	tP	G2	Cult
WL_sC_G2_Cult	82.79	21.92	16.25	97.30	WL	sC	G2	Cult
WL_sM_G2_Cult	65.32	18.44	16.58	91.17	WL	sM	G2	Cult
WL_tP_G2_Cult	83.78	21.84	17.09	96.91	WL	tP	G2	Cult
L_sC_G2_Lit	83.88	21.58	18.10	97.16	L	sC	G2	Lit
L_sM_G2_Lit	78.56	20.96	21.89	96.87	L	sM	G2	Lit
L_tP_G2_Lit	82.57	18.79	24.90	96.74	L	tP	G2	Lit
W_sC_G2_Lit	82.56	15.63	36.21	97.83	W	sC	G2	Lit
W_sM_G2_Lit	77.77	13.77	52.17	95.51	W	sM	G2	Lit
W_tP_G2_Lit	81.01	13.66	45.47	96.50	W	tP	G2	Lit
WL_sC_G2_Lit	83.62	21.72	17.48	97.22	WL	sC	G2	Lit
WL_sM_G2_Lit	78.53	21.37	20.21	96.51	WL	sM	G2	Lit
WL_tP_G2_Lit	83.01	19.41	23.24	97.12	WL	tP	G2	Lit
L_sC_G3_Cult	83.46	20.53	20.46	97.04	L	sC	G3	Cult
L_sM_G3_Cult	79.35	22.53	14.33	95.51	L	sM	G3	Cult
L_tP_G3_Cult	81.33	20.98	18.69	96.76	L	tP	G3	Cult
W_sC_G3_Cult	83.51	17.22	34.71	96.90	W	sC	G3	Cult
W_sM_G3_Cult	80.85	17.65	37.51	96.60	W	sM	G3	Cult
W_tP_G3_Cult	86.10	10.18	60.64	97.49	W	tP	G3	Cult
WL_sC_G3_Cult	83.25	22.10	16.19	97.30	WL	sC	G3	Cult
WL_sM_G3_Cult	79.05	22.59	13.83	95.51	WL	sM	G3	Cult
WL_tP_G3_Cult	81.37	21.21	17.98	96.76	WL	tP	G3	Cult

Tabela A6 Média ( $\bar{X}$ ), máximo (máx.), mínimo (mín.), e desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de Similaridade de Bray-Curtis entre misturas para cada teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).

Teste	$\bar{X}$	$\sigma$	Mín.	Máx.	varAb	varPig	varGrup	varRac
<i>L_sC_G3_Lit</i>	83.79	19.16	25.44	97.23	L	sC	G3	Lit
<i>L_sM_G3_Lit</i>	81.24	20.37	22.10	96.75	L	sM	G3	Lit
<i>L_tP_G3_Lit</i>	82.37	19.32	24.68	96.72	L	tP	G3	Lit
<i>W_sC_G3_Lit</i>	83.12	18.30	28.17	97.90	W	sC	G3	Lit
<i>W_sM_G3_Lit</i>	79.63	13.31	45.67	95.51	W	sM	G3	Lit
<i>W_tP_G3_Lit</i>	80.68	13.18	45.63	95.51	W	tP	G3	Lit
<i>WL_sC_G3_Lit</i>	83.43	21.58	17.63	97.22	WL	sC	G3	Lit
<i>WL_sM_G3_Lit</i>	80.83	20.98	19.67	96.22	WL	sM	G3	Lit
<i>WL_tP_G3_Lit</i>	81.99	19.87	22.73	96.88	WL	tP	G3	Lit
<i>L_sC_G4_Cult</i>	80.00	18.85	19.23	97.51	L	sC	G4	Cult
<i>L_sM_G4_Cult</i>	63.86	30.79	2.89	95.51	L	sM	G4	Cult
<i>L_tP_G4_Cult</i>	61.80	31.43	0.85	95.51	L	tP	G4	Cult
<i>W_sC_G4_Cult</i>	79.73	19.17	18.32	96.60	W	sC	G4	Cult
<i>W_sM_G4_Cult</i>	76.95	20.66	25.92	95.51	W	sM	G4	Cult
<i>W_tP_G4_Cult</i>	79.47	17.98	31.76	95.51	W	tP	G4	Cult
<i>WL_sC_G4_Cult</i>	79.66	19.01	19.12	97.21	WL	sC	G4	Cult
<i>WL_sM_G4_Cult</i>	65.15	21.74	11.23	91.17	WL	sM	G4	Cult
<i>WL_tP_G4_Cult</i>	80.46	17.68	33.93	96.54	WL	tP	G4	Cult
<i>L_sC_G4_Lit</i>	72.87	29.28	5.14	96.60	L	sC	G4	Lit
<i>L_sM_G4_Lit</i>	68.99	26.87	0.00	95.51	L	sM	G4	Lit
<i>L_tP_G4_Lit</i>	76.90	16.99	18.84	94.66	L	tP	G4	Lit
<i>W_sC_G4_Lit</i>	75.59	23.54	11.88	95.51	W	sC	G4	Lit
<i>W_sM_G4_Lit</i>	69.22	25.36	9.79	95.51	W	sM	G4	Lit
<i>W_tP_G4_Lit</i>	71.45	28.11	6.16	95.51	W	tP	G4	Lit
<i>WL_sC_G4_Lit</i>	75.89	26.08	10.38	95.51	WL	sC	G4	Lit

Tabela A6 Média ( $\bar{X}$ ), máximo (máx.), mínimo (mín.), e desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de Similaridade de Bray-Curtis entre misturas para cada teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).

Teste	$\bar{X}$	$\sigma$	Mín.	Máx.	varAb	varPig	varGrup	varRac
WL_sM_G4_Lit	74.95	16.79	28.46	95.00	WL	sM	G4	Lit
WL_tP_G4_Lit	77.71	18.74	22.63	95.23	WL	tP	G4	Lit
L_sC_G5_Cult	80.90	19.56	16.51	97.46	L	sC	G5	Cult
L_sM_G5_Cult	72.10	26.30	10.07	95.51	L	sM	G5	Cult
L_tP_G5_Cult	71.35	31.31	1.34	96.80	L	tP	G5	Cult
W_sC_G5_Cult	76.53	18.00	22.51	97.68	W	sC	G5	Cult
W_sM_G5_Cult	72.10	26.30	10.07	95.51	W	sM	G5	Cult
W_tP_G5_Cult	79.45	17.10	30.08	95.51	W	tP	G5	Cult
WL_sC_G5_Cult	78.85	21.84	12.76	96.60	WL	sC	G5	Cult
WL_sM_G5_Cult	72.10	26.30	10.07	95.51	WL	sM	G5	Cult
WL_tP_G5_Cult	78.37	17.50	35.85	96.34	WL	tP	G5	Cult
L_sC_G5_Lit	72.10	26.30	10.07	95.51	L	sC	G5	Lit
L_sM_G5_Lit	72.10	26.30	10.07	95.51	L	sM	G5	Lit
L_tP_G5_Lit	74.80	22.21	1.40	95.51	L	tP	G5	Lit
W_sC_G5_Lit	72.10	26.30	10.07	95.51	W	sC	G5	Lit
W_sM_G5_Lit	72.10	26.30	10.07	95.51	W	sM	G5	Lit
W_tP_G5_Lit	72.10	26.30	10.07	95.51	W	tP	G5	Lit
WL_sC_G5_Lit	72.10	26.30	10.07	95.51	WL	sC	G5	Lit
WL_sM_G5_Lit	72.10	26.30	10.07	95.51	WL	sM	G5	Lit
WL_tP_G5_Lit	74.17	21.93	15.34	94.56	WL	tP	G5	Lit
L_sC_G6_Cult	79.51	21.01	17.13	97.58	L	sC	G6	Cult
L_sM_G6_Cult	66.39	16.58	16.75	83.18	L	sM	G6	Cult
L_tP_G6_Cult	83.72	21.45	17.99	96.87	L	tP	G6	Cult
W_sC_G6_Cult	83.50	18.15	29.07	96.72	W	sC	G6	Cult
W_sM_G6_Cult	80.41	17.93	28.91	94.44	W	sM	G6	Cult

Tabela A6 Média ( $\bar{X}$ ), máximo (máx.), mínimo (mín.), e desvio padrão ( $\sigma$ ) dos valores de Similaridade de Bray-Curtis entre misturas para cada teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult).

Teste	$\bar{X}$	$\sigma$	Mín.	Máx.	varAb	varPig	varGrup	varRac
W_tP_G6_Cult	82.85	16.89	36.02	95.75	W	tP	G6	Cult
WL_sC_G6_Cult	73.08	20.78	15.34	96.53	WL	sC	G6	Cult
WL_sM_G6_Cult	67.29	17.39	16.09	91.17	WL	sM	G6	Cult
WL_tP_G6_Cult	83.53	21.43	17.88	96.81	WL	tP	G6	Cult
L_sC_G6_Lit	78.78	20.08	18.01	95.92	L	sC	G6	Lit
L_sM_G6_Lit	78.35	21.44	19.65	96.23	L	sM	G6	Lit
L_tP_G6_Lit	83.56	19.83	22.51	96.46	L	tP	G6	Lit
W_sC_G6_Lit	83.00	18.76	26.03	97.05	W	sC	G6	Lit
W_sM_G6_Lit	76.66	13.84	53.29	95.51	W	sM	G6	Lit
W_tP_G6_Lit	81.44	14.27	41.73	96.54	W	tP	G6	Lit
WL_sC_G6_Lit	76.37	19.93	16.83	91.34	WL	sC	G6	Lit
WL_sM_G6_Lit	78.87	20.71	19.46	95.51	WL	sM	G6	Lit
WL_tP_G6_Lit	83.28	19.85	22.11	96.57	WL	tP	G6	Lit

*Tabela A7 Valores de Correlação de Pearson entre o valor obtido por CHEMTAX para cada mistura e o valor estimado, para cada grupo por teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente à variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6.*

Teste	Grupo	Rácio	Abordagem	Pigmentos	Chloro+Prasino	Cyano	Diatom	Dino	Hapto
G1_Cul_L_sC	G1	Cult	L	sC	0.979	0.999	0.733	0.996	0.757
G1_Cul_L_sM	G1	Cult	L	sM	0.965	0.908	0.492	0.996	0.647
G1_Cul_L_tP	G1	Cult	L	tP	0.993	0.998	0.585	0.996	0.703
G1_Cul_W_sC	G1	Cult	W	sC	0.983	0.998	0.789	0.996	0.764
G1_Cul_W_sM	G1	Cult	W	sM	0.997	0.919	0.881	0.997	0.838
G1_Cul_W_tP	G1	Cult	W	tP	0.996	0.996	0.880	0.996	0.844
G1_Cul_WL_sC	G1	Cult	WL	sC	0.971	0.999	0.776	0.996	0.733
G1_Cul_WL_sM	G1	Cult	WL	sM	0.994	0.807	0.903	0.996	0.774
G1_Cul_WL_tP	G1	Cult	WL	tP	0.991	0.998	0.893	0.996	0.840
G1_Lit_L_sC	G1	Lit	L	sC	0.997	0.998	0.732	0.996	0.694
G1_Lit_L_sM	G1	Lit	L	sM	0.985	-0.080	0.635	0.996	0.805
G1_Lit_L_tP	G1	Lit	L	tP	0.993	0.998	0.726	0.996	0.768
G1_Lit_W_sC	G1	Lit	W	sC	0.997	0.999	0.545	0.996	0.704
G1_Lit_W_sM	G1	Lit	W	sM	0.980	-0.248	0.679	0.989	0.659
G1_Lit_W_tP	G1	Lit	W	tP	0.996	0.995	-0.034	0.993	0.646
G1_Lit_WL_sC	G1	Lit	WL	sC	0.997	0.999	0.503	0.996	0.692
G1_Lit_WL_sM	G1	Lit	WL	sM	0.986	-0.061	0.644	0.997	0.793
G1_Lit_WL_tP	G1	Lit	WL	tP	0.996	0.998	0.764	0.996	0.786
G2_Cul_L_sC	G2	Cult	L	sC	0.976	0.977	0.843	0.992	0.404
G2_Cul_L_sM	G2	Cult	L	sM	0.835	0.888	0.845	0.995	0.343

*Tabela A7 Valores de Correlação de Pearson entre o valor obtido por CHEMTAX para cada mistura e o valor estimado, para cada grupo por teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6.*

Teste	Grupo	Rácio	Abordagem	Pigmentos	Chloro+Prasino	Cyano	Diatom	Dino	Hapto
G2_Cul_L_tP	G2	Cult	L	tP	0.992	0.991	0.828	0.990	0.402
G2_Cul_W_sC	G2	Cult	W	sC	0.987	0.983	0.868	0.990	0.445
G2_Cul_W_sM	G2	Cult	W	sM	0.964	0.910	0.845	0.992	0.457
G2_Cul_W_tP	G2	Cult	W	tP	0.997	0.991	0.853	0.989	0.493
G2_Cul_WL_sC	G2	Cult	WL	sC	0.976	0.977	0.841	0.992	0.404
G2_Cul_WL_sM	G2	Cult	WL	sM	0.846	0.889	0.844	0.995	0.342
G2_Cul_WL_tP	G2	Cult	WL	tP	0.990	0.991	0.826	0.990	0.398
G2_Lit_L_sC	G2	Lit	L	sC	0.986	0.979	0.845	0.992	0.412
G2_Lit_L_sM	G2	Lit	L	sM	0.977	-0.119	0.832	0.989	0.418
G2_Lit_L_tP	G2	Lit	L	tP	0.998	0.996	0.843	0.988	0.442
G2_Lit_W_sC	G2	Lit	W	sC	0.997	0.997	0.859	0.978	0.575
G2_Lit_W_sM	G2	Lit	W	sM	0.991	0.059	0.854	0.975	0.723
G2_Lit_W_tP	G2	Lit	W	tP	0.998	0.997	0.860	0.967	0.650
G2_Lit_WL_sC	G2	Lit	WL	sC	0.984	0.978	0.844	0.992	0.410
G2_Lit_WL_sM	G2	Lit	WL	sM	0.976	0.105	0.828	0.989	0.410
G2_Lit_WL_tP	G2	Lit	WL	tP	0.997	0.994	0.840	0.989	0.430
G3_Cul_L_sC	G3	Cult	L	sC	0.982	0.979	0.852	0.992	0.415
G3_Cul_L_sM	G3	Cult	L	sM	0.976	0.907	0.815	0.992	0.382
G3_Cul_L_tP	G3	Cult	L	tP	0.977	0.948	0.826	0.991	0.413
G3_Cul_W_sC	G3	Cult	W	sC	0.986	0.986	0.872	0.988	0.469
G3_Cul_W_sM	G3	Cult	W	sM	0.973	0.912	0.881	0.990	0.619
G3_Cul_W_tP	G3	Cult	W	tP	0.986	0.985	0.928	0.993	0.865
G3_Cul_WL_sC	G3	Cult	WL	sC	0.981	0.978	0.840	0.992	0.406
G3_Cul_WL_sM	G3	Cult	WL	sM	0.976	0.907	0.814	0.992	0.381

*Tabela A7 Valores de Correlação de Pearson entre o valor obtido por CHEMTAX para cada mistura e o valor estimado, para cada grupo por teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6.*

Teste	Grupo	Rácio	Abordagem	Pigmentos	Chloro+Prasino	Cyano	Diatom	Dino	Hapto
G3_Cul_WL_tP	G3	Cult	WL	tP	0.977	0.949	0.824	0.991	0.411
G3_Lit_L_sC	G3	Lit	L	sC	0.985	0.986	0.861	0.989	0.440
G3_Lit_L_sM	G3	Lit	L	sM	0.981	0.920	0.834	0.990	0.416
G3_Lit_L_tP	G3	Lit	L	tP	0.984	0.962	0.840	0.988	0.442
G3_Lit_W_sC	G3	Lit	W	sC	0.991	0.995	0.857	0.981	0.455
G3_Lit_W_sM	G3	Lit	W	sM	0.997	0.987	0.836	0.973	0.626
G3_Lit_W_tP	G3	Lit	W	tP	0.992	0.998	0.860	0.963	0.651
G3_Lit_WL_sC	G3	Lit	WL	sC	0.981	0.978	0.845	0.992	0.409
G3_Lit_WL_sM	G3	Lit	WL	sM	0.979	0.916	0.829	0.991	0.404
G3_Lit_WL_tP	G3	Lit	WL	tP	0.981	0.956	0.836	0.989	0.433
G4_Cul_L_sC	G4	Cult	L	sC	0.972	0.999	0.773	0.996	0.751
G4_Cul_L_sM	G4	Cult	L	sM	0.857	0.878	0.456	0.998	0.673
G4_Cul_L_tP	G4	Cult	L	tP	0.849	0.893	0.695	0.997	0.618
G4_Cul_W_sC	G4	Cult	W	sC	0.980	0.998	0.766	0.996	0.773
G4_Cul_W_sM	G4	Cult	W	sM	0.988	0.932	0.904	0.997	0.776
G4_Cul_W_tP	G4	Cult	W	tP	0.997	0.996	0.887	0.996	0.815
G4_Cul_WL_sC	G4	Cult	WL	sC	0.971	0.999	0.778	0.996	0.747
G4_Cul_WL_sM	G4	Cult	WL	sM	0.935	0.929	0.781	0.997	0.709
G4_Cul_WL_tP	G4	Cult	WL	tP	0.991	0.999	0.891	0.996	0.801
G4_Lit_L_sC	G4	Lit	L	sC	0.996	0.998	0.732	0.996	0.692
G4_Lit_L_sM	G4	Lit	L	sM	0.979	-0.179	0.451	0.995	0.712
G4_Lit_L_tP	G4	Lit	L	tP	0.997	0.927	0.650	0.997	0.788
G4_Lit_W_sC	G4	Lit	W	sC	0.997	0.999	0.601	0.996	0.713
G4_Lit_W_sM	G4	Lit	W	sM	0.984	0.026	0.736	0.987	0.673



*Tabela A7 Valores de Correlação de Pearson entre o valor obtido por CHEMTAX para cada mistura e o valor estimado, para cada grupo por teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6.*

Teste	Grupo	Rácio	Abordagem	Pigmentos	Chloro+Prasino	Cyano	Diatom	Dino	Hapto
G4_Lit_W_tP	G4	Lit	W	tP	0.998	0.989	0.683	0.991	0.654
G4_Lit_WL_sC	G4	Lit	WL	sC	0.995	0.998	0.709	0.996	0.702
G4_Lit_WL_sM	G4	Lit	WL	sM	0.983	0.189	0.654	0.997	0.801
G4_Lit_WL_tP	G4	Lit	WL	tP	0.997	0.992	0.736	0.997	0.746
G5_Cul_L_sC	G5	Cult	L	sC	0.983	0.999	0.740	0.996	0.759
G5_Cul_L_sM	G5	Cult	L	sM	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Cul_L_tP	G5	Cult	L	tP	0.983	0.937	0.504	0.997	0.673
G5_Cul_W_sC	G5	Cult	W	sC	0.983	0.998	0.784	0.996	0.781
G5_Cul_W_sM	G5	Cult	W	sM	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Cul_W_tP	G5	Cult	W	tP	0.979	0.943	0.886	0.997	0.808
G5_Cul_WL_sC	G5	Cult	WL	sC	0.983	0.999	0.730	0.996	0.742
G5_Cul_WL_sM	G5	Cult	WL	sM	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Cul_WL_tP	G5	Cult	WL	tP	0.983	0.938	0.879	0.997	0.796
G5_Lit_L_sC	G5	Lit	L	sC	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Lit_L_sM	G5	Lit	L	sM	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Lit_L_tP	G5	Lit	L	tP	0.982	0.945	0.673	0.996	0.742
G5_Lit_W_sC	G5	Lit	W	sC	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Lit_W_sM	G5	Lit	W	sM	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Lit_W_tP	G5	Lit	W	tP	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Lit_WL_sC	G5	Lit	WL	sC	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Lit_WL_sM	G5	Lit	WL	sM	0.990	0.995	0.802	0.991	0.672
G5_Lit_WL_tP	G5	Lit	WL	tP	0.981	0.943	0.720	0.996	0.733
G6_Cul_L_sC	G6	Cult	L	sC	0.912	0.998	0.878	0.996	0.361
G6_Cul_L_sM	G6	Cult	L	sM	0.981	0.817	0.844	0.995	0.342

*Tabela A7 Valores de Correlação de Pearson entre o valor obtido por CHEMTAX para cada mistura e o valor estimado, para cada grupo por teste. Variação de abordagem: W, WL, e L; variação de Pigmentos: tP, sC e sM; variação de Grupo: G1, G2, G3, G4, G5 e G6; variação na Origem de Rácios: Cult e Lit. Cada teste é identificado com a sigla correspondente á variação efetuada, eg. G6\_Cult\_L\_tP neste teste foi utilizada a abordagem L, foram mantidos na matriz todos os pigmentos (tP) utilizados sete taxa (G6), sendo que os rácios utilizados foram obtidos a partir das concentrações pigmentares das espécies cultivadas (Cult). Note-se que independentemente dos Pigmentos, da abordagem, ou rácios inseridos, os grupos que surgem maioritariamente como melhores são G2, G3, e G6.*

Teste	Grupo	Rácio	Abordagem	Pigmentos	Chloro+Prasino	Cyano	Diatom	Dino	Hapto
G6_Cul_L_tP	G6	Cult	L	tP	0.991	0.991	0.828	0.990	0.402
G6_Cul_W_sC	G6	Cult	W	sC	0.993	0.984	0.864	0.990	0.452
G6_Cul_W_sM	G6	Cult	W	sM	0.991	0.933	0.854	0.994	0.435
G6_Cul_W_tP	G6	Cult	W	tP	0.997	0.993	0.854	0.989	0.490
G6_Cul_WL_sC	G6	Cult	WL	sC	0.853	0.999	0.874	0.996	0.349
G6_Cul_WL_sM	G6	Cult	WL	sM	0.960	0.849	0.842	0.995	0.342
G6_Cul_WL_tP	G6	Cult	WL	tP	0.988	0.993	0.831	0.991	0.396
G6_Lit_L_sC	G6	Lit	L	sC	0.870	0.998	0.880	0.997	0.366
G6_Lit_L_sM	G6	Lit	L	sM	0.972	-0.107	0.827	0.991	0.402
G6_Lit_L_tP	G6	Lit	L	tP	0.991	0.993	0.840	0.989	0.418
G6_Lit_W_sC	G6	Lit	W	sC	0.997	0.992	0.852	0.988	0.450
G6_Lit_W_sM	G6	Lit	W	sM	0.986	-0.142	0.838	0.972	0.714
G6_Lit_W_tP	G6	Lit	W	tP	0.998	0.998	0.852	0.973	0.610
G6_Lit_WL_sC	G6	Lit	WL	sC	0.877	0.998	0.877	0.996	0.359
G6_Lit_WL_sM	G6	Lit	WL	sM	0.981	0.752	0.832	0.992	0.394
G6_Lit_WL_tP	G6	Lit	WL	tP	0.996	0.993	0.837	0.989	0.421

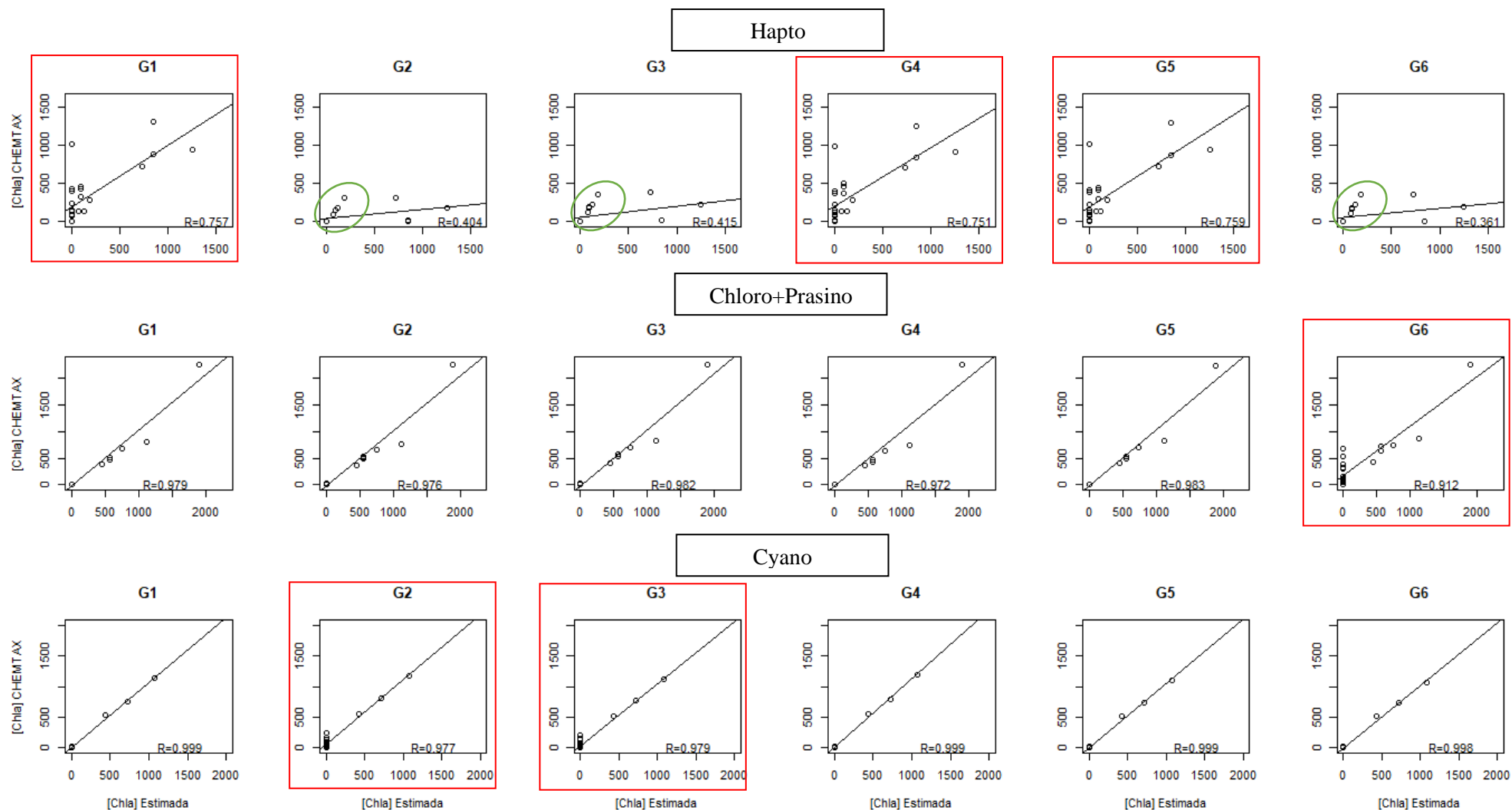


Figura A2 Equações lineares exemplo e valor de coeficiente de correlação de Pearson. Representa a relação existente entre a concentração de Chl a obtida por CHEMTAX e o valor teórico estimado (real). As molduras a vermelho representam os testes onde ocorre maior dispersão dos resultados em baixas concentrações, isto é, falsos positivos. Circulos a verde mostram um bom desempenho no teste a baixas concentrações.

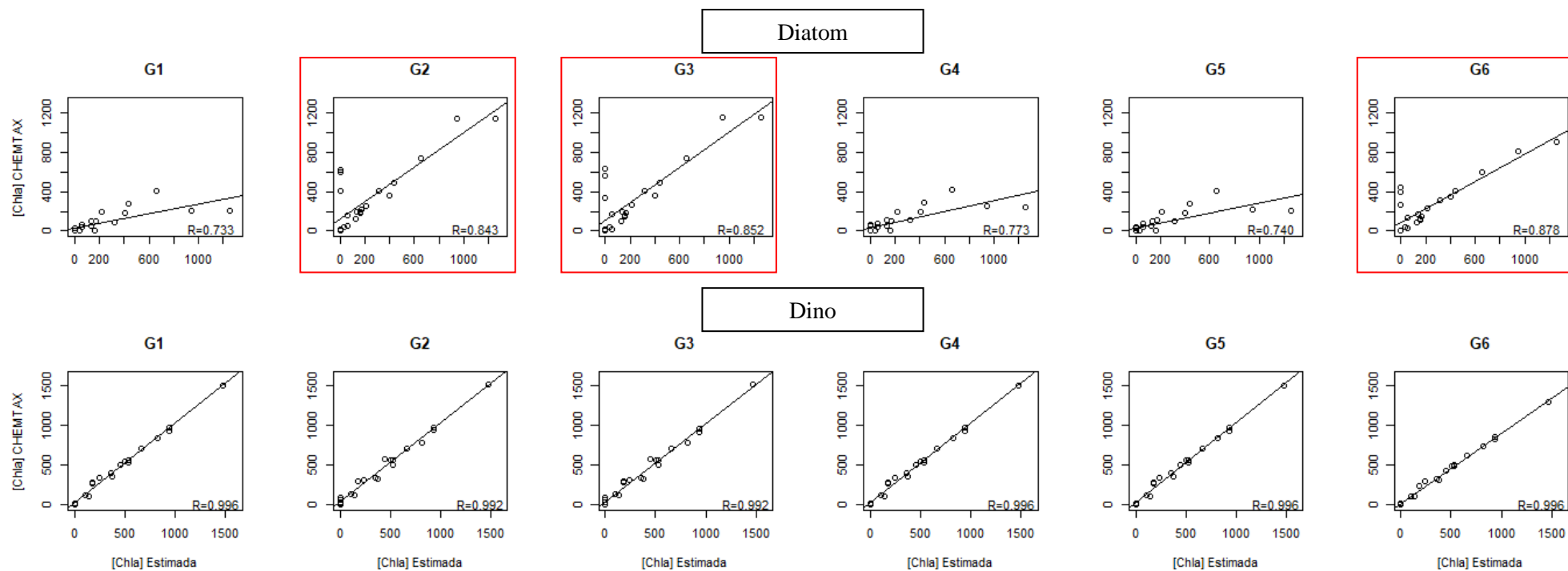


Figura A2 Regressões lineares exemplo e valor de coeficiente de correlação de Pearson. Representa a relação existente entre a concentração de Chl a obtida por CHEMTAX e o valor teórico estimado (real). As molduras a vermelho representam os testes onde ocorre maior dispersão dos resultados em baixas concentrações, isto é, falsos positivos. Circulos a verde mostram um bom desempenho no teste a baixas concentrações.

Tabela A8 Correlação de Pearson sem padronização dos taxa.

		Chloro+Prasino			Cyano	Diatom	Dino	Hapto		
		Chloro1	Chloro2	Prasino2	Cyano1	Diatom1	Dino1	Hapto1	Hapto3	Hapto6
<b>G1</b>	$\bar{X}$	0.857	0.940	0.645	0.790	0.674	0.996	0.399	0.657	0.995
	$\sigma$	0.166	0.102	0.404	0.428	0.219	0.002	0.159	0.267	0.001
<b>G2</b>	$\bar{X}$	0.824		0.528	0.810	0.844	0.988	0.453		
	$\sigma$	0.106		0.400	0.370	0.011	0.007	0.100		
<b>G3</b>	$\bar{X}$	0.982			0.958	0.847	0.988	0.480		
	$\sigma$	0.006			0.033	0.027	0.008	0.128		
<b>G4</b>	$\bar{X}$	0.853		0.631	0.815	0.703	0.996	0.434	0.681	0.995
	$\sigma$	0.123		0.338	0.377	0.140	0.002	0.140	0.245	0.001
<b>G5</b>	$\bar{X}$	0.984			0.951	0.698	0.995	0.437	0.652	0.995
	$\sigma$	0.004			0.046	0.137	0.004	0.143	0.270	0.001
<b>G6</b>	$\bar{X}$	0.878	0.864	0.709	0.835	0.850	0.990	0.428		
	$\sigma$	0.246	0.251	0.369	0.357	0.018	0.007	0.096		

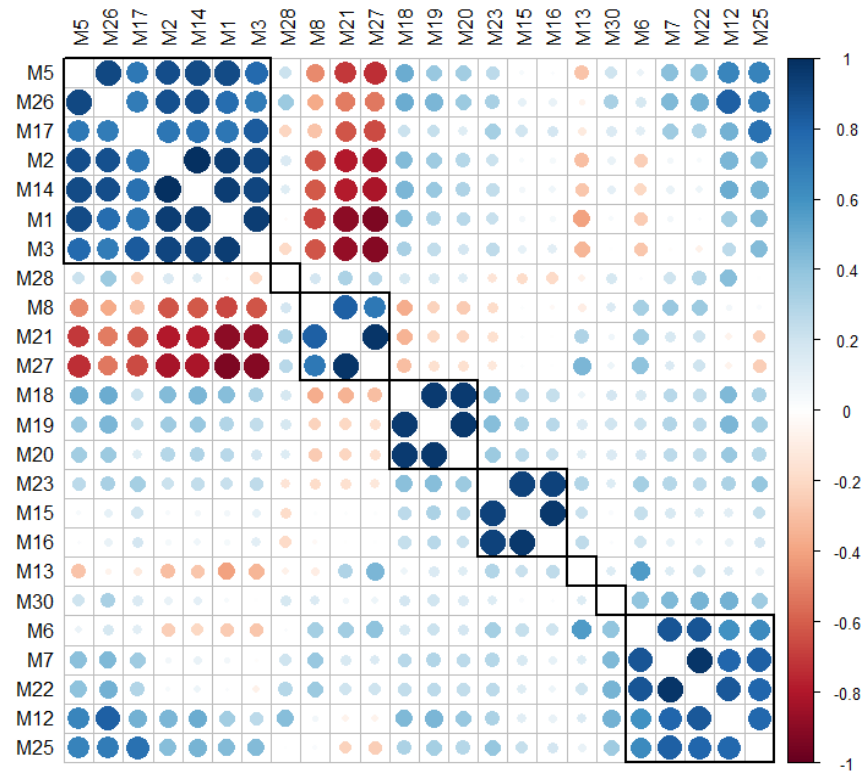


Figura A3 Gráfico de correlações de Pearson entre os valores de Similaridade de Bray-Curtis para as Misturas, ordenado pela semelhança entre os valores de correlação obtidos, agrupamento hierárquico (grelha a bold)